

**Untersuchungen zum Stoffwechsel der Aminosäuren Aspartat und  
Glutamat, sowie ihrer Amide in *Pseudomonas*:  
Klonierung und Charakterisierung von Amidohydrolase-Genen.  
Konstruktion und Analyse von Transposon-Mutanten**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Anja Hüser**

aus

Meschede

**Marburg / Lahn 1999**

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 08.12.1999 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. H. Röhm

## **Danksagung**

Herrn Prof. K. H. Röhm danke ich für die Themenstellung und Betreuung während der Entstehung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. M. A. Marahiel möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Allen Mitgliedern der AG Röhm und AG Löffler danke ich für das sehr gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Bettina Rohde, Ute Klöppner, Stefan Schleper und Holger Lindner für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Ute Klöppner und Uli Sievers für den Spaß, den wir (auch bei der Arbeit) miteinander hatten, sowie die kulinarische und computertechnische Unterstützung.

Meinen Eltern möchte ich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in der Rhizosphäre - (Die Rhizosphäre) .....	2
1.2	Wachstumsfördernde Mikroorganismen .....	3
1.3	Klassifizierung der <i>Pseudomonas</i> -Pflanzen-Wechselwirkung .....	4
1.3.1	A) Indirekte Stimulation des Pflanzenwachstums (Biokontrolle) .....	4
1.3.2	B) Direkte Förderung des Pflanzenwachstums .....	5
1.3.3	C) „Bioheilung“ (Biologische Entgiftung) .....	6
1.4	Besiedlungsfaktoren .....	7
1.5	Wurzelexsudate .....	8
1.6	Pseudomonaden .....	8
1.7	Stickstoffassimilation in Bakterien .....	10
1.8	Bakterielle Amidasen und Stickstoffassimilation .....	11
1.9	Transport Stickstoff-haltiger Verbindungen in Bakterien .....	13
1.10	Aminosäuren als Kohlenstoffquelle .....	14
1.11	Aufgabenstellung .....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>16</b>
2.1	Geräte .....	16
2.2	Chemikalien .....	17
2.3	Enzyme .....	17
2.4	DNA-, RNA- und Protein-Marker .....	18
2.5	Kits .....	18
2.6	Zusätzliche spezielle Materialien .....	19
2.7	Medien .....	19
2.8	Antibiotika .....	21
2.9	Weitere Medienzusätze .....	22
2.10	Mikroorganismen .....	22
2.11	Plasmide .....	23
2.12	Oligonukleotide .....	24
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>25</b>
3.6	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Pseudomonas</i> .....	25
3.7	Präparation von Plasmid-DNA .....	27
3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
3.9	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen .....	29
3.10	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen .....	30
3.11	DNA-Ligation .....	30
3.12	Agarosegelelektrophorese .....	31
3.13	Ethidiumbromid-Färbung von Agarosegelen .....	32
3.14	Präparation von DNA aus Agarosegelen .....	32
3.15	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	33
3.15.1	Herstellung RbCl-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	33
3.16	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen .....	34
3.17	DNA-Sequenzierung .....	35
3.17.1	Denaturierung .....	35
3.17.2	Hybridisierung des Primers .....	36
3.17.3	Kettenverlängerung .....	36
3.17.4	Kettenabbruchreaktion .....	37
3.18	Hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
3.19	Konstruktion einer $\lambda$ -ZAP-Express Genbank .....	40
3.19.1	Partielle Restriktion von genomischer DNA aus <i>P. fluorescens</i> .....	41
3.19.2	Dichtegradientenzentrifugation .....	42
3.19.3	Tropfendialyse und DNA-Fällung .....	42
3.19.4	Ligation mit dem ZAP-Express-Vektor .....	43
3.19.5	Verpackung der Ligationsansätze .....	43
3.20	Titerbestimmung der Genbank .....	44
3.21	Herstellung einer Asparaginase-Sonde zum Screenen der Genbank .....	44

3.22	DIG-Markierung der Asparaginase-Sonde .....	45
3.23	Abschätzung der Ausbeute der DIG-Markierung der Sonde .....	46
3.24	Optimierung der Sondenkonzentration .....	47
3.25	Screening der Genbank mit der DIG-markierten Asparaginase-Sonde .....	47
3.25.1	Plaque Lifts .....	47
3.25.2	Proteinase K-Behandlung.....	48
3.25.3	Hybridisierung.....	48
3.25.4	Stringente Waschschrte.....	49
3.26	Chemilumineszenz-Detektion.....	49
3.27	<i>In vivo</i> excision.....	51
3.28	Genome Walker PCR .....	52
3.29	Isolierung von Gesamt-RNA .....	55
3.29.1	RNA-Isolierung mit Guanidinisothiocyanat und Phenol.....	55
3.29.2	RNA-Isolierung mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ von BM.....	55
3.30	5'- RACE.....	57
3.31	RNA-Markierung mit Digoxigenin .....	60
3.32	Northernblot-Analyse .....	60
3.33	Überexpression der <i>P. fluorescens</i> Glutaminase-Asparaginase.....	63
3.34	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	64
3.35	Reinigung der rekombinanten PF-GA-His <sub>8</sub> über IMAC.....	66
3.36	Konjugativer Transfer von Plasmiden .....	68
3.37	Aktivitätstests .....	70
3.37.1	Bestimmung der Asparaginase-Aktivität mit L-Asparaginsäure- $\beta$ -Hydroxamat .....	70
3.37.2	Mikrotiterplatten-AHA-Test .....	72
3.37.3	Glutamatbestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase, Diaphorase und Tetrazoliumsalzen....	73
3.37.4	Gekoppelter optischer Test.....	75
3.38	Mikrotiter-Glycerinstock-Platten.....	77
3.39	Umstempeln von Bakterienkolonien.....	77
3.40	Selektion auf $\gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten.....	77
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>79</b>
4.1	Herstellung einer $\lambda$ -ZAP-Express Genbank von <i>P. fluorescens</i> .....	79
4.2	Herstellung einer DIG-markierten Asparaginase-Sonde .....	79
4.3	Klonierung des Asparaginasegens aus <i>P. fluorescens</i> .....	81
4.4	Analyse des <i>ansB</i> -Gens .....	85
4.5	Identifizierung eines Signalpeptids der Pf-GA .....	87
4.6	Vergleich der von dem <i>ansB</i> -Gen aus <i>P. fluorescens</i> erhaltenen Sequenz mit der Aminosäuresequenz des nativ gereinigten Proteins:.....	88
4.7	Identifizierung eines Endonukleasegens.....	89
4.8	Überexpression und Reinigung der rekombinanten Pf-GA-His <sub>8</sub> .....	90
4.9	Bestimmung der Substratspezifität der rekombinanten Pf-GA-His <sub>8</sub> .....	92
4.10	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>ansB</i> -Gens .....	93
4.11	Promotoridentifizierung.....	93
4.12	Bestimmung der <i>ansB</i> -Transkriptgröße durch Northernblot-Analyse .....	95
4.13	Nachweis der $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit des <i>ansB</i> -Gens.....	96
4.14	Identifizierung weiterer Asparaginase-Gene in anderen <i>Pseudomonas</i> -Stämmen .....	98
4.15	Klonierung und Analyse eines <i>ansB</i> -Gens aus <i>P. fluorescens</i> Pf 5 .....	99
4.16	Erzeugung von Mutanten durch Zufalls-Tn5-Mutagenese .....	100
4.17	Suche nach Mutanten mit Defekten im Abbau der Aminosäuren Glutamin, Glutamat, ..... Asparagin und Aspartat .....	101
4.18	Gezielte Selektion.....	101
4.19	Suche nach Mutanten mit Defekten in der Asparaginverwertung .....	104
4.20	Suche nach Mutanten mit Defekten in der Glutamatverwertung.....	113
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>114</b>
5.1	Klonierung einer Glutaminase-Asparaginase aus <i>P. fluorescens</i> WT .....	114
5.2	Regulation der Pf-GA .....	118
5.2.1	$\sigma^{54}$ -abhängige Promotoren .....	118
5.2.2	Regulation von $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren durch Aktivatorproteine.....	119
5.2.3	$\sigma^{54}$ -abhängige Expression des <i>ansB</i> -Gens in <i>P. fluorescens</i> .....	122
5.2.4	Regulation anderer Asparaginasegene .....	123
5.3	Die Glutaminase-Asparaginase des Biokontroll-Stammes <i>P. fluorescens</i> Pf-5.....	125

5.4	Transposon-Mutagenese zur Identifizierung weiterer am Aminosäurestoffwechsel beteiligter Enzyme .....	125
5.4.1	Das Transposon Tn5-OT182 .....	126
5.4.2	Selektionsstrategien.....	127
5.5	Identifizierung eines extrazellulären Endonukleasegens - <i>endX</i> .....	134
5.6	Ausblick.....	135
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>142</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	

# **1 Einleitung**

Die Erforschung der Interaktion von Pflanzen mit Mikroorganismen der Rhizosphäre erlangt immer größere Bedeutung. Durch die zunehmende Einflußnahme des Menschen auf das Wachstum der Kulturpflanzen werden einerseits die Erträge der Nutzflächen gesteigert, andererseits erhöht sich aber auch die Gefahr des Auftretens von Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschädlingen. (Pflanzenkrankheiten durch Mikroorganismen). Meistens wurde der Schädlingsbefall durch den Einsatz von Pestiziden zurückgedrängt. Dabei wurden die Gefahren für Menschen und Umwelt durch den steigenden Einsatz chemischer Schädlingsbekämpfungsmittel oft nicht richtig erkannt oder verdrängt. Die negativen Auswirkungen dieser Stoffe auf die empfindlichen Ökosysteme wurde erst in den letzten Jahren beachtet. Dabei spielt vor allem die Anreicherung von Pestiziden im Grund- und Trinkwasser und damit auch in der Nahrungskette eine entscheidende Rolle. Auch der übermäßige Einsatz von Düngemitteln, und der daraus resultierenden Anreicherung in Bächen, Flüssen und Seen, führt zu einer Schädigung vieler Ökosysteme.

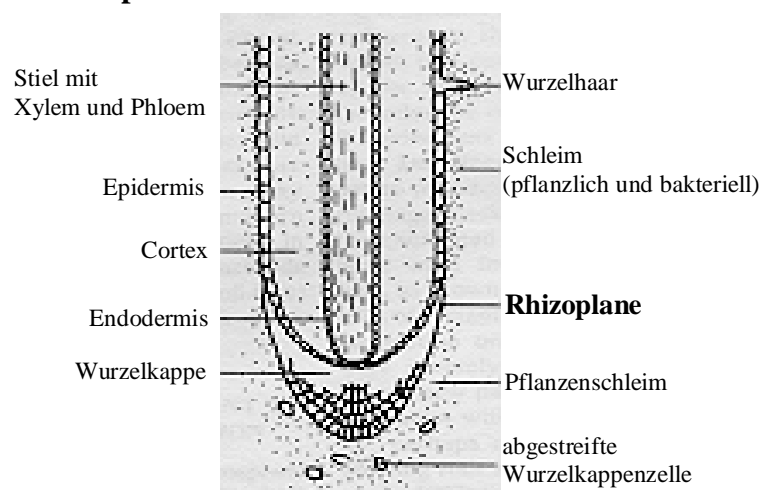
Nicht zuletzt durch das zunehmend negative Ansehen dieser Stoffe in der Bevölkerung, wird intensiver nach Alternativen gesucht, um diese Stoffe durch ungefährlichere zu ersetzen. Eine Möglichkeit zur biologischen Pflanzenkontrolle ist der Einsatz bestimmter natürlich vorkommender oder genetisch veränderter Mikroorganismen, die in der Lage sind die Felderträge zu steigern, Pflanzenkrankheiten und ihre Erreger sowie andere Schädlinge zurückzudrängen. Obwohl in den letzten 25 Jahren schon viele Untersuchungen zur Erforschung der Rhizosphäre und ihrer Bewohner durchgeführt wurden, erfordert ein kommerzieller Einsatz von natürlichen Biokontroll-Organismen eine noch genauere Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Bodenmikroorganismen und den Pflanzen.

## 1.1 Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in der Rhizosphäre - (Die Rhizosphäre)

Im allgemeinen bezeichnet man als Rhizosphäre den Teil des Bodens, der die Pflanzenwurzeln umgibt. Nach Lynch [Lynch, 1990] kann dieser Bereich in drei Zonen unterteilt werden: die Ectorhizosphäre, die Rhizoplane und die Endorhizosphäre. Die Ectorhizosphäre ist der Teil des Bodens, der die Pflanze direkt umgibt. Sie kann einen beträchtlichen Abstand von der Wurzel einnehmen, z. B. dann, wenn sich Wechselwirkungen der Wurzel mit Mycorrhiza-Pilzen (Mycorrhizosphäre) entwickeln. Zur Ectorhizosphäre gehören auch die Wurzelhaare, der Schleim, der die Wurzel umgibt, sowie abgestreifte Wurzelkappenzellen. Als Rhizoplane wird die eigentliche Wurzeloberfläche bezeichnet. Unter der Endorhizosphäre versteht man das Gebiet innerhalb der Wurzel, das von einigen Bakterien besiedelt werden kann. Hierzu gehören der Wurzelstiel mit der Endo- und Epidermis, der Kortex und die Wurzelkappe. Die Bedingungen in der Rhizosphäre werden durch die gegenseitige Beeinflussung des Bodens, der Pflanzenwurzeln und der mit den Wurzeln assoziierten Organismen bestimmt. Die Wechselwirkungen von Rhizosphären-Mikroorganismen und Pflanzen können fördernd, neutral oder schädlich für die Pflanze sein. Dabei können die Bedingungen, die in der Rhizosphäre herrschen, diese Wechselwirkungen beeinflussen. Der Untersuchung der fördernden Eigenschaften bestimmter Mikroorganismen kommt dabei eine immer größere Bedeutung zu. Ziel dieser Forschung ist es, die besten genetischen Eigenschaften / Merkmale für eine spezifische Anwendung in einem Mikroorganismus zu vereinigen.

### Endorhizosphäre

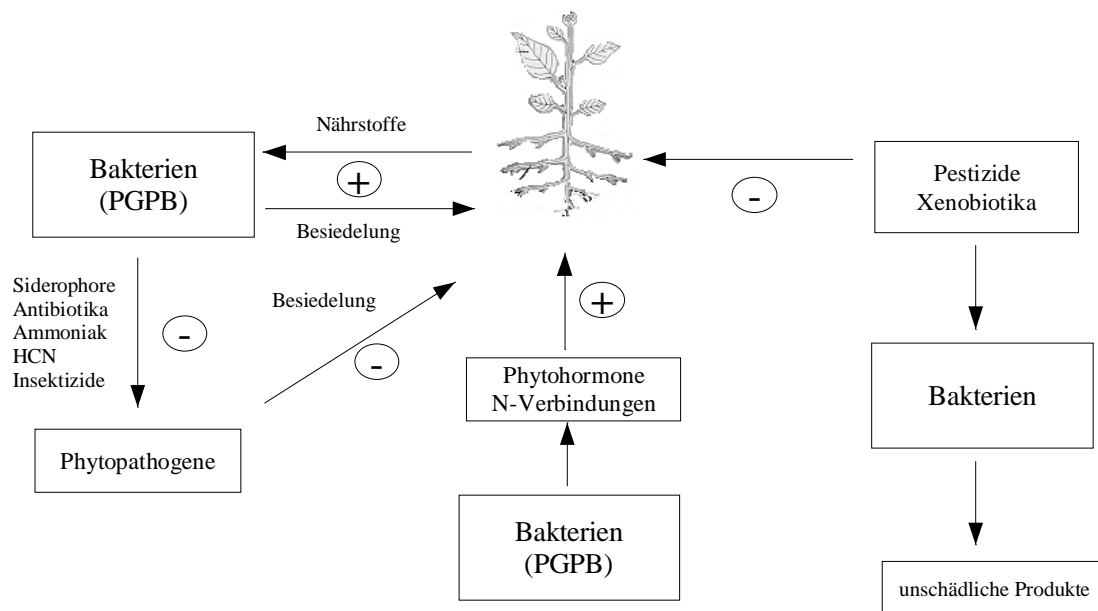
### Ectorhizosphäre





## 1.2 Wachstumfördernde Mikroorganismen

Als wachstumsfördernde Mikroorganismen bezeichnet man Rhizobakterien, die direkt oder indirekt das Pflanzenwachstum fördern. Zu diesen Bakterien gehören unter anderem Vertreter der Genera *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* und *Bacillus* [O'Sullivan & O'Gara, 1992]. Obwohl einige Pseudomonaden, wie *P. syringae*, als Pflanzenpathogene bekannt sind, wurden andere Mitglieder der fluoreszierenden Pseudomonaden, wie z. B. *P. fluorescens* und *P. putida*, als vielversprechendste Gruppe von pflanzenwachstumsfördernden Rhizobakterien identifiziert. Versuche zeigten, daß sie sehr häufig an der Biokontrolle von Pflanzenkrankheiten beteiligt sind [O'Sullivan & O'Gara, 1992].



Von großer Bedeutung sind auch verschiedenen andere frei-lebenden, assoziative und symbiotische Stickstoff-fixierende Prokaryoten, sowie nicht-prokaryotische Mycorrhizapilze. Die Pilze versorgen die Pflanzen in erster Linie mit Phosphat, während die Stickstoff-fixierenden Bakterien die Pflanze mit Stickstoff versorgen und sie so zumindest teilweise, unabhängig von im Boden vorhandenen Stickstoffverbindungen machen.

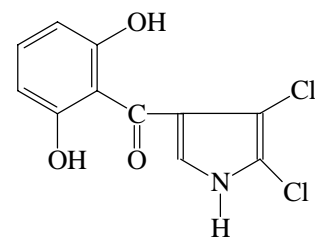
### 1.3 Klassifizierung der *Pseudomonas*-Pflanzen-Wechselwirkung

Nach Lugtenberg [Lugtenberg *et al.*, 1992] kann man die *Pseudomonas*-Pflanzen-Wechselwirkungen in drei Klassen unterteilen, wobei diese Klassifizierung auch auf andere Pflanzen-Mikroorganismen-Wechselwirkungen zutrifft.

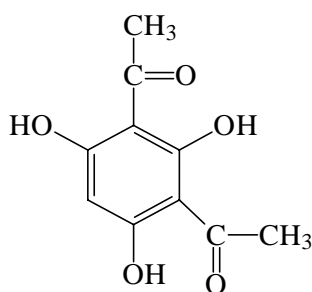
#### 1.3.1 A) Indirekte Stimulation des Pflanzenwachstums (Biokontrolle)

Biokontrollorganismen verstärken das Pflanzenwachstum und die Pflanzengesundheit durch verschiedene Mechanismen. Einige dieser Bodenbakterien fördern das Pflanzenwachstum indirekt dadurch, daß sie für die Pflanze schädliche Organismen, wie z. B. andere Mikroorganismen, Insekten oder Unkraut unterdrücken bzw. zurückdrängen. Dabei wenden die Biokontroll-Bakterien verschiedenen Strategien an.

Eine Strategie zur Unterdrückung schädlicher Mikroorganismen ist die Produktion von Antibiotika und leicht flüchtigen Substanzen wie Ammoniak und Blausäure (HCN). Es sind viele von *Pseudomonas* produzierte Antibiotika bekannt, unter ihnen Phenazine, Pyoluteorin, Tropolon und 2,4-Diacetylphloroglucinol [O'Sullivan & O'Gara, 1992]. Dabei können die Antibiotika nicht nur positive Wirkungen verursachen. Dadurch, daß einige dieser Antibiotika, z. B. das Tropolon, sehr effektiv gegen viele Bakterien und Pilze wirken [Lifshitz *et al.*, 1987], kann die Eliminierung vieler die Pflanze ebenfalls fördernder Organismen nicht ausgeschlossen werden. Zu den spezifischer wirkenden



Pyoluteorin



2,4-Diacetylphloroglucinol

antimikrobiellen Substanzen gehören das 2,4-Diacetylphloroglucinol und das Pyoluteorin. 2,4-Diacetylphloroglucinol wirkt z. B. gegen *Phytophthora ultimum*, einem Bakterium, das Zucker- und Baumwollsämlinge schädigt. [Howell *et al.*, 1980; O'Sullivan & O'Gara, 1992]. Weitere wichtige Metabolite für die Biokontrolle sind flüchtige Substanzen, wie  $\text{NH}_3$  und HCN. So ist die von

einigen *Pseudomonaden* *in vitro* produzierte Menge an HCN toxisch für pathogene Pilze, wie z. B. *Thielaviopsis basicola*. Dieser Pilz, der die schwarze Wurzelfäulnis von

Tabakpflanzen verursacht, kann auf diese Weise unterdrückt werden [O'Sullivan & O'Gara, 1992]. Andererseits können die HCN-Mengen, die von einigen *Pseudomonas*-Spezies freigesetzt werden auch das Pflanzenwachstum beeinträchtigen. So wurden die Ertragsverluste von Kartoffeln und einiger Getreidearten auf HCN-produzierende *Pseudomonaden* zurückgeführt [Bakker *et al.*, 1987]. Auch Insekten können von den Mikroorganismen erfolgreich bekämpft werden. Das bekannteste Beispiel für von einem Bodenbakterium produzierte Insektengifte sind die Endo- und Exotoxine von *Bacillus thuringiensis*. Diese auch als „BT Toxine“ bekannten Proteine wurden in den letzten 30 Jahren gegen Schmetterlingsplagen eingesetzt [O'Gara *et al.*, 1999].

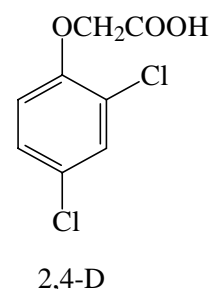
### **1.3.2 B) Direkte Förderung des Pflanzenwachstums**

Diese Art der Förderung basiert auf der Produktion von Substanzen, die als Wachstums-Stimulatoren wirken können, man spricht auch von Pflanzenwachstumshormonen. Dabei konnte in Versuchen das Wachstum weiter verstärkt werden, wenn biosynthetische Vorstufen der Hormone von außen zugeführt wurden [Lugtenberg & de Weger, 1992; Arshad & Frankenberger]. Eine weitere für die Landwirtschaft sehr bedeutende Strategie zur Förderung des Pflanzenwachstums, sind die sogenannten Biodünger. Sie bestehen aus mikrobiellen Inokulaten, die die Pflanzen mit Nährstoffen versorgen, die sonst durch chemische Düngemittel zugeführt werden müßten. Die wichtigsten Biodünger sind Prokaryoten, die die Pflanze mit Stickstoff versorgen. Obwohl viele Eubakterien und Archaeobakterien in der Lage sind, elementaren Stickstoff aus der Luft zu Ammoniak zu reduzieren, haben nur einige dieser Bakterien die Fähigkeit entwickelt (direkt) Stickstoff-fixierende Symbiosen mit höheren Pflanzen auszubilden. Die für die Landwirtschaft bedeutendste ist die intrazelluläre Symbiose zwischen *Rhizobium* und Hülsenfrüchte-tragenden Pflanzen, wie z. B. Bohnen, Sojabohnen und Erbsen, sowie einiger Futterpflanzen, z. B. Klee und Luzerne. Dabei wird auf der Pflanzenwurzel ein spezielles Organ gebildet, das als Knöllchen bezeichnet wird. In diesen Organen wandeln *Rhizobium*bakterien atmosphärischen Stickstoff in Ammoniak um, der zum größten Teil an die Pflanzenwurzel abgegeben wird. Im Gegenzug dazu versorgt die Pflanze die Bakterien mit anderen Nährstoffen. Weitere Wechselwirkungen von Mikroorganismen und landwirtschaftlich wichtiger Nutzpflanzen sind die Rhizocenosen (biocenotische Beziehung) von *Acetobacter* mit

Zuckerrohr und Süßkartoffeln, *Achromobacter* mit Reis und *Azospirillum* mit Gerste, Reis und Weizen, sowie *Klebsiella* mit Reis und Süßkartoffeln [O’Gara *et al.*,1999].

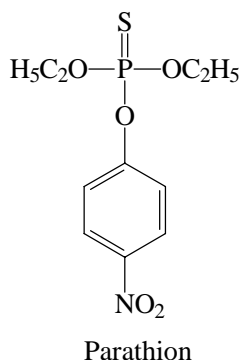
### 1.3.3 C) „Bioheilung“ (Biologische Entgiftung)

Als Bioheilung bezeichnet man den Einsatz von biologischen Agenzien (Bakterien / Pilze) um chemische Schadstoffe zu entgiften oder ihre Konzentration in der Umwelt zu reduzieren. Die Strukturen vieler synthetischer Pestizide basieren auf relativ einfachen aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoff-Grundgerüsten, die eine Vielzahl von Substituenten, wie Halogene, Phosphat-, Nitratgruppen, tragen können. Die biologische Entgiftung beruht auf der Tatsache, daß viele Schadstoffe natürlich vorkommenden Substanzen ähnlich sind und deshalb von Mikroorganismen abgebaut werden können. Andere Substanzen haben Strukturen, die in der Natur unbekannt sind (Xenobiotika), und sind deshalb häufig resistent gegenüber dem mikrobiellen Abbau. Es werden deshalb zwei Arten von Xenobiotika unterschieden:



1) Xenobiotika, die schnell, meistens innerhalb einer „Erntesaison“ abgebaut werden können. Diese Stoffe werden heute häufig als Pestizide eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist 2,4-D ( 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure), ein Herbizid, das in 4-6 Wochen abgebaut werden kann.

2) Die zweite Gruppe von Xenobiotika besteht aus sehr widerstandsfähigen Pestiziden, die für lange Zeiträume (Monate/Jahre) im Boden erhalten bleiben. Beispiele hierfür sind die Insektizide Parathion ((O,O-Diethyl-O-p-Nitrophenyl-phosphothioat) und DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan), die im Boden für mehr als 15 Jahre erhalten bleiben. DDT wurde von 1930 bis zu seinem Verbot 1979 intensiv eingesetzt. Stabile Metabolite dieses Stoffes wurden im Boden, im Grundwasser und auch im Menschen gefunden. Aufgrund des Anreicherungsrisikos wird der Einsatz



von Xenobiotika der zweiten Gruppe vermieden. Zu den Bakteriengruppen, die in der Lage sind Xenobiotika abzubauen, gehören Gram-negative Aerobier, vor allem *Pseudomonas*-Arten, fakultative Anaerobier, z. B. Enterobakterien, und Gram-positive Bakterien, wie z. B. *Bacillus*-Arten und *Corynebakterien*. Auch von der Industrie in die

Umwelt eingebrachte Schadstoffe, wie z. B. polychlorierte Biphenyle (PCBs), können von einigen Bakterien unschädlich gemacht werden. Durch effektives Einbringen von Bakterien, die Gene für den Xenobiotika-Abbau tragen, in den Boden, könnten Pestizide und andere Umweltgifte abgebaut werden. Da die Wurzel den Boden in einem ausgedehnten Netzwerk durchdringt, könnte durch Besiedlung der Wurzel mit solchen Bakterien eine Bodenschicht von ca. 1 m Dicke behandelt werden. Dabei läßt sich die Effektivität dieser Behandlung durch genetisch veränderte Bakterien steigern, die Gene für den Abbau spezieller Substanzen tragen [Lugtenberg & de Weger, 1992].

Obwohl viele Beispiele für die Unterdrückung von Pflanzenkrankheiten und Förderung des Pflanzenwachstums bekannt sind [Lutgenberg & de Weger, 1992], erhält man bei Feldversuchen unterschiedliche Ergebnisse über die Effektivität der einzelnen Mikroorganismen. Der Grund für die schlechten Ergebnisse, die man bei Feldversuchen mit Pflanzenwachstums-fördernden Bakterien erhält, ist häufig die schwache Besiedlung des Wurzelsystems durch die Biokontroll-Bakterien. Eine erfolgreiche Besiedlung des Wurzelsystems ist aber die Grundvoraussetzung für einen fördernden Einfluß der Bakterien auf die Pflanze.

## **1.4 Besiedlungsfaktoren**

Obwohl zahlreiche der untersuchten Pseudomonaden *in vitro* einen positiven Einfluß auf das Pflanzenwachstum haben, scheitert ihr Einsatz in Feldversuchen häufig an der unzureichenden Besiedlung des Wurzelsystems der Wirtspflanzen. Um die Besiedlungsfähigkeit zu verbessern und dadurch den Einsatz von Biokontroll-Bakterien effektiver zu gestalten, müssen die an der Rhizosphärenbesiedlung beteiligten Mechanismen auch auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Der Besiedlungsvorgang ist sehr komplex und hängt von vielen verschiedenen Faktoren, wie Feuchtigkeit, Temperatur, pH-Wert, Bodentyp, Zusammensetzung der Wurzelexsudate, Mineraliengehalt und anderen Mikroorganismen, ab. Deshalb müssen die Biokontroll-Bakterien folgende Kriterien erfüllen: Erstens müssen sie erfolgreich um die verfügbaren Nährstoffe konkurrieren können. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von Siderophoren, die den Pseudomonaden einen Wachstumsvorteil unter Eisen-limitierenden Bedingungen verschafft. Zweitens müssen die Bakterien dem teilweise sehr schnell wachsenden Wurzelsystemen folgen können. Es wird vermutet, daß die

Chemotaxis zu den Wurzelexsudaten und die Anlagerung an die Wurzel den Bakterien dies ermöglichen könnte [Lugtenberg & Weger, 1992; Vande Broek *et al.*, 1995]. Außerdem müssen Biokontrollorganismen in der Lage sein, toxische Verbindungen, wie Phenole und Radikale, die von den Pflanzen abgegeben werden, unschädlich zu machen. Auch der Angriff von Bakteriophagen und anderen schädlichen Mikroorganismen, wie *Bdellovibrio* und Protozoen [Stephens *et al.*, 1987; Acea *et al.*, 1988], stellt eine Gefahr für die Rhizosphärenbewohner dar. Die Produktion von Bakteriotoxinen und Antibiotika ist den Pseudomonaden bei der Verteidigung von Vorteil.

## 1.5 Wurzelexsudate

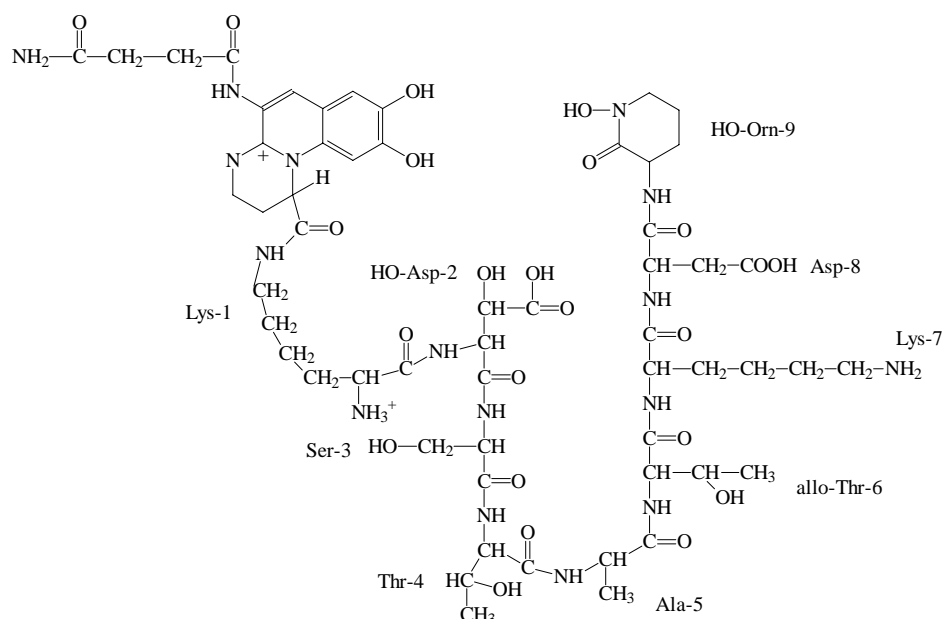
Die von den Pflanzen abgegebenen Wurzelexsudate scheinen eine entscheidende Nährstoffquelle für die Rhizobakterien darzustellen. Die Exsudate bestehen hauptsächlich aus Zuckern, Aminosäuren und organischen Säuren. Aber auch komplexe Kohlenhydrate, Alkohole, Vitamine, Lysate und Hormone kommen vor [Kluepfel *et al.*, 1993]. Die Zusammensetzung der Exsudate variiert mit biotischen (z. B. Pflanzenart, Alter, Nährstoffstatus) und abiotischen Faktoren (z. B. Temperatur, Bodenstruktur, Vorhandensein von Pestiziden, Zufuhr von Sauerstoff und Wasser). Die Gesamtmenge an abgegebenen Exsudaten, Wurzelkappen(zellen) und Wurzelschleim kann 3 - 15 % des Trockengewichtes der Pflanze betragen [Campell & Graeves, 1990]. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß die Aminosäuren den größten Anteil der exsudierten Substanzen ausmachten. Dabei kamen die Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Glutamat und Aspartat zu 40-50 % vor [Barber & Gunn, 1974]. Ein Grund für den hohen Anteil dieser Aminosäuren ist möglicherweise die Tatsache, daß Glutamat und Glutamin zentrale Intermediate des bakteriellen Stickstoff-Stoffwechsels sind.

## 1.6 Pseudomonaden

*P. fluorescens* und *P. putida* gehören zu den fluoreszierenden Pseudomonaden. Die fluoreszierenden Pseudomonaden unterscheiden sich von anderen Pseudomonaden

durch die Fähigkeit, ein wasserlösliches gelb-grün-fluoreszierendes Pigment zu bilden. Sie sind Gram-negative, chemoheterotrop bewegliche Stäbchen, die polare Geißeln besitzen. Sie werden nach Palleroni *et al.* in der rRNA-Homologie-Gruppe I zusammengefaßt [Palleroni *et al.*, 1973]. Fluoreszierende Pseudomonaden haben einfache Nährstoffbedürfnisse und kommen in der Natur sehr häufig vor. Verbreitungsgebiete sind Böden, Blattpflanzen, Süßwasser, Sedimente und Seewasser. Sie haben Bedeutung bei der biologischen Pflanzenkontrolle, Pflanzenpathogenese, beim Verderb von Lebensmitteln aber auch in der medizinischen Pathogenese.

Einige fluoreszierende Pseudomonaden, zu denen auch verschiedenen *P. fluorescens*- und *P. putida*-Stämme gehören, haben unter anderem durch ihre Fähigkeit Siderophore zu bilden, Bedeutung bei der Biokontrolle erlangt. Siderophore sind Stoffe, die Eisen sehr effizient komplexieren. Die fluoreszierenden Pseudomonaden im Boden produzieren normalerweise gelb-grün-fluoreszierende, wasserlösliche Siderophore. Der Grund für die Produktion dieser Siderophore ist die begrenzte Verfügbarkeit von Eisen in der Rhizosphäre. Da jedoch fast alle lebenden Organismen Eisen für das Wachstum benötigen, können die Mikroorganismen der Rhizosphäre nur überleben, wenn sie in der Lage sind, Eisen in ausreichenden Mengen zu gewinnen. Unter Eisen-Mangel-Bedingungen sezernieren die Pseudomonaden die Siderophore in den Boden. Aufgrund der sehr hohen Affinität zu  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bilden sich sehr starke  $\text{Fe}^{3+}$ -Siderophor-Komplexe. Diese Komplexe sind für andere Mikroorganismen nicht verfügbar. Der

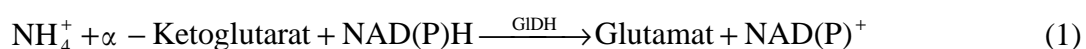


Pseudobactin 358, ein Pseudobactin, das von dem Stamm *P. putida* WCS358 [Hofstad *et al.*, 1986] produziert wird. HO-Orn =  $\delta$ -N-Hydroxyornithin; HO-Asp =  $\alpha$ -Hydroxyaspartat;

Stamm, der die Siderophore produziert hat, kann diese jedoch über einen sehr spezifischen Rezeptor in der äußeren Zellmembran aufnehmen und verwerten [Buyer *et al.*, 1986]. Dadurch erhalten die fluoreszierenden Pseudomonaden einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen, auch schädlichen Bakterien und Pilzen [Loper & Buyer, 1991].

## 1.7 Stickstoffassimilation in Bakterien

Viele Bakterien sind in der Lage, verschiedene Stickstoffverbindungen als Stickstoffquellen zu nutzen. In diesen Verbindungen liegt der Stickstoff in unterschiedlichen Oxidationsstufen vor (z.B.  $\text{NH}_4^+$  (-3),  $\text{NO}_3^-$  (+5),  $\text{N}_2$  (0), Aminosäuren (-3), Harnstoff (-3), Purine (-3), Pyrimidine (-3)). In den Zellen hat der Stickstoff in den meisten Verbindungen (Aminogruppe, heterocycl. N) die gleiche Oxidationsstufe wie im Ammoniumion. Bei der Stickstoffassimilation werden deshalb die verfügbaren N-Substrate von den Bakterien zu  $\text{NH}_4^+$  reduziert oder hydrolysiert. Innerhalb der Zellen sind Glutamat und Glutamin, sowie Aspartat und Carbamoylphosphat die wichtigsten Stickstoff-Donatoren [Merrick & Edwards, 1995; Fuchs, 1999]. Dabei dient Glutamin als direkter Stickstoff-Donor für die Biosynthese der meisten N-Verbindungen der Zelle, wie z. B. der Purin- und Pyrimidinnukleotide, von Glucosamin-6-phosphat, p-Aminobenzoessäure und der Nicotinamid-Derivate. Im Gegensatz zu Glutamin, das nur einen indirekten Donor für die Aminogruppe von Aminosäuren darstellt, ist Glutamat der universelle Donor für die  $\text{NH}_2$ -Gruppe der Aminosäuren und verschiedenen Amino-Transferase-Reaktionen. Bei der Stickstoffassimilation stehen den Bakterien zwei Wege zur Verfügung, um aus dem aufgenommenen  $\text{NH}_4^+$  Glutamat bzw. Glutamin zu bilden. Welche der beiden Möglichkeiten von den Bakterien genutzt wird hängt von der Ammoniumkonzentration ab. Bei hohen  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen wird  $\text{NH}_4^+$  durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) in einer NAD(P)H-abhängigen Reaktion auf  $\alpha$ -Ketoglutarat übertragen, wodurch Glutamat entsteht (1)



Da die GIDH einen relativen hohen  $K_m$ -Wert von ca. 0,1 mM besitzt, ist sie bei Ammoniummangel ineffektiv. Bei niedrigeren  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen wird deshalb der



Glutamin-Synthetase (GS) / Glutamat-Synthase (GOGAT)-Weg beschriftet (2). Dabei wird  $\text{NH}_4^+$  in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die GS auf Glutamat übertragen. Das durch diese Reaktion entstandene Glutamin wird durch das Enzym Glutamin-2-oxoglutarat-amino-transferase (GOGAT) auf  $\alpha$ -Ketoglutarat übertragen. In dieser NADPH-abhängigen Reaktion entstehen zwei Glutamatreste.

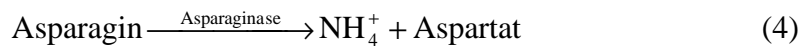


Obwohl bei Ammoniummangel hauptsächlich dieser Weg für die Assimilation von Stickstoff genutzt wird, ist die GS auch bei hohen  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen, bei denen der GIDH-Weg beschriftet wird, aktiv. Über das Produkt der GS-Reaktion, Glutamin, ist die  $\text{NH}_4^+$ -Assimilation direkt mit dem verschiedenen Biosynthesewegen zur Produktion von Proteinen, Nukleinsäuren etc., verbunden. Obwohl Ammoniumionen die bevorzugte N-Quelle für Bakterien darstellen, müssen die Bakterien dennoch in der Lage sein eine Vielfalt alternativer Stickstoffquellen zu verwerten. Dazu müssen weitere Enzyme für die Aufnahme und den Metabolismus von den Zellen zur Verfügung gestellt werden. Wie bei der  $\text{NH}_4^+$ -Assimilation wird die Synthese und in einigen Fällen auch die Aktivität dieser Proteine direkt durch die Verfügbarkeit ihrer Substrate reguliert [Merrick & Edwards, 1995]. In Enterobakterien bezeichnet man diese Regulation als „Stickstoff-Kontrolle“. Die biochemischen und genetischen Mechanismen, die die „Stickstoff-Kontrolle“ ermöglichen, sind in den Enterobakterien weitgehend aufgeklärt. Die Elemente dieses Systems, das auch als *ntr*-System bezeichnet wird, wurden auch in vielen anderen Bakterien nachgewiesen [Merrick & Edwards, 1995].

## 1.8 Bakterielle Amidasen und Stickstoffassimilation

Wie bereits erwähnt wurde, können viele Bakterien außer Ammoniumionen auch andere stickstoffhaltigen Verbindungen verwerten. Die meisten dieser Verbindungen werden von bestimmten Enzymen zu  $\text{NH}_4^+$  reduziert oder hydrolysiert. Zu diesen Enzymen gehören die Amidasen. Eine der bekanntesten Amidasen ist die Glutaminase-

Asparaginase, die Glutamin und / oder Asparagin zu  $\text{NH}_4^+$  und Glutamat bzw. Aspartat hydrolysiert (4).



Dabei ist eine genaue Trennung zwischen Glutaminasen und Asparaginasen nicht möglich, da die meisten dieser Enzyme beide Substrate umsetzen. Glutaminasen / Asparaginasen wurden unter anderem in folgenden Bakterien gefunden: *E. coli* (*ansB*) [Jennings & Beacham, 1990], *Pseudomonas sp.* 7A (PGA) [Roberts, 1976], *P. stutzeri* MB-405 [Manna *et al.*, 1995], *P. aeruginosa* [Wilson *et al.*, 1995], *W. succinogenes* (*ansA*) [Lubkowski *et al.*, 1996], *B. subtilis* (*ansA*) [Sun & Setlow, 1991], und *S. enterica* (*ansB*) [Jennings *et al.*, 1993]. Vor allem die *E. coli* Asparaginase hat besondere Bedeutung erlangt, da sie als Tumortheraeutikum bei bestimmten Leukämieformen eingesetzt wird [Gallagher *et al.*, 1989]. Diese hochaffine Asparaginase ist im Periplasma lokalisiert, besitzt einen niedrigen  $K_m$ -Wert und wird durch das FNR- und CRP-Protein kontrolliert [Jennings & Beacham, 1993]. In dem im Boden lebenden Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* liegt das Gen für die Asparaginase (*ansA*) in dem *ans*-Operon, das zusätzlich noch eine Aspartase (*ansB*) und ein Repressorprotein (*ansR*) kodiert. Dieses Operon wird durch die Verfügbarkeit von Ammoniumionen und Aspartat reguliert [Sun & Setlow, 1993].

In Bezug auf die Pflanzen-Mikroorganismen-Wechselwirkungen sind besonders die Asparaginasen, die in einigen *Pseudomonas* Stämmen (*Pseudomonas sp.* 7A, *P. stutzeri* MB-405), gefunden wurden, zu beachten. Die bekannteste unter ihnen, die PGA aus *Pseudomonas sp.* 7A wurde nur als Protein isoliert und sequenziert [Roberts, 1976]. Sie zeigt große Homologien zu anderen bakteriellen Asparaginasen.

In einigen Pflanzen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* und *Lupinus angustifolius* wurden gleichfalls Asparaginasen identifiziert und deren Gene kloniert [Vincze *et al.*, 1994; Dickson *et al.*, 1992; Casado *et al.*, 1995].

Da Asparagin in manchen Pflanzen, wie z. B. in der Lupinie, eine zentrale Funktion im Metabolismus und interzellulären Transport von Stickstoff besitzt, wird vermutet, daß die Asparaginase in Pflanzen ebenfalls für die Stickstoffassimilation und Asparagin-Verwertung von Bedeutung ist [Casado *et al.*, 1995]. So ist Asparagin z. B. in *Lupinus angustifolius* die Hauptkomponente, die von den Knöllchen an die Wurzel abgegeben wird. Außerdem werden 50-70 % des Stickstoffs, die die Pflanze ihren Samen zur

Verfügung stellt in Form von Asparagin abgegeben. Die Asparaginasen der Pflanzen bzw. Pflanzensamen können das Asparagin zu Aspartat und  $\text{NH}_4^+$  abbauen und sind so in der Lage Stickstoff für die Synthese von Aminosäuren und Proteinen zu erhalten. Im Hinblick auf die Wechselwirkungen der Pflanzen mit Mikroorganismen könnte die Abgabe von Asparagin an die Samen und somit an die Rhizosphäre in sofern von Bedeutung sein, daß Bakterien mit hoher Asparaginase-Aktivität einen Selektionsvorteil bei der Besiedelung der Wurzel hätten.

## 1.9 Transport Stickstoff-haltiger Verbindungen in Bakterien

Um die verschiedenen Stickstoffquellen effektiv verwerten zu können, müssen die Stickstoffverbindungen zunächst in die Zelle transportiert werden. Für  $\text{NH}_3$  wird angenommen, daß es schnell durch die Cytoplasmamembran diffundieren kann. Aufgrund des Auftretens sehr großer  $\text{NH}_4^+$ -Gradienten über bakterielle Membranen, wurde zusätzlich ein aktives  $\text{NH}_4^+$ -Transportsystem vermutet. Bis jetzt konnte jedoch erst ein Gen für den aktiven Ammonium-Transport aus *E. coli* kloniert werden [Barnes *et al.*, 1993]. Die Aktivität dieses Systems (*amtA*) wird einerseits durch die vorhandenen  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen kontrolliert. Andererseits wird eine Kontrolle durch das *ntr*-System vermutet.

Über den Transport anderer N-haltiger Verbindungen ist noch nicht sehr viel bekannt. Bis jetzt wurden erst einige Gene für Aminosäure-Transporter identifiziert. Ein Beispiel hierfür ist das Transport-Protein für L-Asparagin in *S. enterica* [Jennings *et al.*, 1995] sowie der Glutamat-Aspartat-Carrier von *E. coli* [Tolner *et al.*, 1992]. Wie Untersuchungen an *R. capsulatus* zeigen, kann ein Transporter verschiedene Aminosäuren transportieren. Weiterhin gibt es Indizien für mehr als ein Transportsystem für eine Aminosäure in Bakterien. So gibt es in *R. capsulatus* außer einem Transportsystem für Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat, mindestens einen weiteren Transporter für die genannten Aminosäuren, der jedoch eine geringere Affinität besitzt [Zheng & Haselkorn, 1996].

## 1.10 Aminosäuren als Kohlenstoffquelle

In der Zelle dienen außer  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  die Aminosäuren als Stickstoff-Donatoren für die Synthese stickstoffhaltiger Verbindungen. Dabei fungieren Glutamat und Glutamin primär, sowie Aspartat und Carbamoylphosphat sekundär als Stickstoff-Überträger. [Merrick & Edwards 1995; Fuchs, 1999]. Neben ihrer Funktion als Stickstoffquelle sind die Aminosäuren nach den Kohlenhydraten die zweitwichtigste Kohlenstoffquelle in Prokaryoten. Sie werden für die Synthese von Proteinen und anderen Biomolekülen verwendet. Da überschüssige Aminosäuren im Gegensatz zu den Fetten und Kohlenhydraten nicht gespeichert werden können, werden sie als Brennstoffe genutzt. Dazu wird zunächst die  $\alpha$ -Aminogruppe entfernt und das übrigbleibenden Kohlenstoffgerüst in ein gängiges Stoffwechselprodukt überführt. Aus den Kohlenstoffgerüsten aller 20 Aminosäuren entstehen nur sieben verschiedenen Moleküle: Pyruvat (aus Ala, Gly, Cys, Ser, Thr, Trp), Acetyl-CoA (Trp, Ile, Leu), Acetoacetyl-CoA (Leu, Lys, Phe, Tyr, Trp),  $\alpha$ -Ketoglutarat (Glu, Gln, His, Pro, Arg), Succinyl-CoA (Ile, Met, Val), Fumarat (Tyr, Phe, Asp) und Oxalacetat (Asn, Asp). Diese sieben Moleküle sind wichtige Intermediate im Stoffwechsel (z. B. im Citratzyklus, Glykolyse und Gluconeogenese, Fettsäureabbau, der Bildung von Ketonkörpern, und in Bakterien und Pflanzen außerdem im Glyoxylatzyklus). In dem komplizierten Netzwerk des Aminosäureabbaus besitzt das Glutamat eine zentrale Aufgabe. Glutamat selbst wird zu  $\alpha$ -Ketoglutarat desaminiert. Die Amidgruppe von Glutamin (oder Asparagin) wird durch eine Glutaminase (oder Asparaginase) hydrolysiert. Es entsteht  $\text{NH}_4^+$  und Glutamat bzw. Aspartat. Auch die Aminosäuren Prolin, Arginin und Histidin werden zunächst in Glutamat überführt.

Die Aminosäuren werden also einerseits zum Aufbau verschiedener Kohlenstoffgerüste verwendet, andererseits werden sie auch zur Energiegewinnung abgebaut.

Die Aminosäureverwertung ist also, nicht nur in Prokaryoten, von Bedeutung als Stickstoff-, sondern auch als Kohlenstoffquelle.

## 1.11 Aufgabenstellung

Zur Untersuchung der Aminosäureverwertung in *Pseudomonas* sollten stellvertretend in dem Stamm *P. fluorescens* Enzyme identifiziert, kloniert und charakterisiert werden, die

an der Verstoffwechselung der in der Rhizosphäre von Pflanzen häufig auftretenden Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Asparagin und Aspartat beteiligt sind. Zu diesen Enzymen gehören die Amidohydrolasen, unter denen die Glutaminasen / Asparaginasen die bekanntesten Vertreter sind. Aufgrund der vorliegenden Sequenzinformationen, von bereits klonierten Glutaminasen-Asparaginasen sollte eine spezifische Asparaginase-Sonde hergestellt werden, mit der aus einer *P. fluorescens*-Genbank ein Asparaginase-Glutaminase-Gen kloniert werden konnte.

Anschließend sollte mit Hilfe der Transposon-Mutagenese nach weiteren Enzymen in *P. fluorescens* gesucht werden, die an der Verwertung der oben genannten Aminosäuren beteiligt sind.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tab. 2.1:** In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller/Lieferant
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Gelkammer Modell B2	AGS GmbH, Heidelberg
Autoklav	Dampfsterilisator VST 40/60S	Zirbus Apparate- und Maschinenbau GmbH; Osterode
Brutschrank		Heraeus; Hanau
Digitalkamera	D 120 Zoom Digital Camera	Kodak
Elektrophorese Dokumentation	Kodak Digital Science EDAS 120 System	Kodak
Heizblöcke	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
	Techne DB2A	Techne
Hybridisierungsflaschen	Hybridisation bottles	Amersham, Braunschweig
Hybridisierungsöfen	Hybridisierungsöfen, Midi Dual 14	MWG Biotech; München
Inkubationsschüttler	G 25	New Brunswick Scientific Nürtingen
Inkubationsschüttler	Novotron AK 82	Infors HT AG; CH-4103 Bottmingen
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Reader 3550 UV mit Steuerungssoftware Kinetic Collector	Biorad, München
Peristaltische Pumpe	Typ P-1	Pharmacia, Freiburg
Photodrucker	Kodak SP 700 Color Printer	Kodak
Photometer	U-2000 Spektralphotometer	Hitachi, Tokyo
Power-Supply	Consort E 452	AGS GmbH, Heidelberg
Sequenzgel-Elektrophoresekammer	Modell S2	Life Technologies, Eggenstein
Sterilbank	D624 RF	Schirp Reinraumtechnik
Sterilisierschrank	Trockensterilisator UT12	Heraeus Instruments
Thermocycler	Cetus	Perkin Elmer, Langen
Tischzentrifuge	EBA 12	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	Centrifuge 5415C	Eppendorf; Hamburg
Video-Scanner	Mitsubishi Video Copy Prozessor mit Thermoprinter	Mitsubishi
Zentrifugen	Suprafuge 22	Heraeus Sepatech
	J2-21	Beckmann
	Minifuge RF	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus	Sorvall, Dupont

## 2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Applichem (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Amersham (Braunschweig) und Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

## 2.3 Enzyme

**Tab. 2.2:** In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	calf intestine alkaline phosphatase (CIP)	Boehringer Mannheim
DNA-Polymerasen	cloned Pfu-Polymerase Long PCR System	Stratagene, Heidelberg peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Pwo-Polymerase	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Taq-Polymerase	peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Restriktionsenzyme		Boehringer Mannheim (=Roche Diagnostics), Mannheim
Reverse Transcriptase	SuperScript™ II	Life Technologies, Eggenstein
RNaseA		Qiagen; Hilden
terminale Deoxynukleotidyl-Transferase		Life Technologies, Eggenstein
T4-DNA Ligase	T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T3-RNA-Polymerase		Roche, Mannheim
T7-RNA-Polymerase		Roche, Mannheim
Diaphorase		Sigma, Deisenhofen
Glutamat-Dehydrogenase		Sigma, Deisenhofen

## 2.4 DNA-, RNA- und Protein-Marker

**Tab. 2.3:** In dieser Arbeit verwendete Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
$\lambda$ Hind III	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
$\lambda$ BstE II	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
$\lambda$ Eco RI / Hind III	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
1 kb DNA-Leiter	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
100 bp Leiter	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
100 bp Leiter Plus	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNA-Sizer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNA-Längenstandard I; DIG-markiert	Boehringer Mannheim, Mannheim
Dalton-Marker VII-L	Sigma, Deisenhofen

## 2.5 Kits

**Tab. 2.4:** In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Hersteller
5'RACE System for rapid amplification of cDNA ends) Version 2.0	Life Technologies, Eggenstein
DIG Northern Starter Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Tissue kit	Qiagen, Hilden
Qiagen genomic-tip 500/G	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
High Pure RNA Isolation Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim
TALONspin Columns	Clontech Laboratories, Heidelberg
T7-Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit	USB / Amersham, Braunschweig
ZAP Express predigested Vector Kit	Stratagene, Heidelberg
ZAP predigested Gigapack cloning Kit	Stratagene, Heidelberg



## 2.6 Zusätzliche spezielle Materialien

**Tab. 2.5:** In dieser Arbeit verwendete spezielle Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Polypropylen mesh for hybridisation bottles	Amersham, Braunschweig
96-Well-plates, steril	GreinerGmbH; Frickenhausen
96-Well-plates; unsteril	GreinerGmbH; Frickenhausen
MF-Membranfilter (Cellulose-Mischester); 0,025 µm Porengröße	Millipore; Eschborn
Cellulose-Acetat-Filter; 0,2 µm Porengröße	Sartorius; Göttingen

## 2.7 Medien

Die verwendeten Medien bzw. ihre Bestandteile wurden im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121 °C, 1,3 bar). Lösungen und Medienzusätze, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße (Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert. Zur Herstellung fester Nährmedien wurden die jeweiligen Medien mit 1,5 % Agar versetzt.

### LB-Medium

Luria Bertani Medium [Sambrook *et al.*, 1989]

NaCl	10	g/l
Trypton	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
		pH 7,0

### M1-Medium

Anzuchtmedium für *Pseudomonas* [DSM; 1993]

Pepton	5	g/l
Fleischextrakt	3	g/l
		pH 7,0

**MG-Medium**(Mannitol-Glutamat-Medium (Keane *et al.*, 1970))

Mannitol	10	g/l
L-Glutaminsäure	2	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	g/l
NaCl	0,2	g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g/l

**M9-Minimalmedium**[Sambrook *et al.*, 1989]**5x M9<sup>-</sup> - Lösung**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , wasserfrei	36,06	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15	g/l
NaCl	2,5	g/l
		pH 7,4

**5xM9<sup>+</sup> - Lösung**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , wasserfrei	36,06	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15	g/l
NaCl	2,5	g/l
NH <sub>4</sub> Cl	5	g/l
		pH 7,4

**weitere Lösungen für M9-Medium**

MgSO <sub>4</sub> -Lösung	1	M	autoklaviert
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	1	M	autoklaviert
20 % Glucose			sterilfiltriert

**M9<sup>+</sup>-Medium**= M9-Minimalmedium mit 22,2 mM Glucose und 18,6 mM NH<sub>4</sub>Cl

M9 <sup>+</sup> - Lösung	1	Volumenteil
dH <sub>2</sub> O	4	Volumentile
autoklavieren		
+ 20 % Glucose	8	ml
+ 1 M MgSO <sub>4</sub>	0,8	ml
+ 1 M CaCl <sub>2</sub>	10	µl

**M9<sup>-</sup> - Medium**

= M9-Minimalmedium ohne Glucose (22.2 mM) und ohne Ammoniumchlorid (18,6 mM)

Die Aminosäure, die statt dessen als einzige C- und N-Quelle eingesetzt wurde, ist jeweils angegeben

M9 <sup>-</sup> - Lösung	1	Volumenteil
dH <sub>2</sub> O	4	Volumentile
autoklavieren		
+ 1 M MgSO <sub>4</sub>	0,8	ml
+ 1 M CaCl <sub>2</sub>	40	µl

**NZY-Medium**

NaCl	5	g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NZ Amin (Casein Hydrolysat)	10	g/l
	pH 7,5 (mit NaOH)	

**NZY Top Agar**

NZY-Medium		
Agarose	0,7 %	(w/v)

**2.8 Antibiotika**

**Tab. 2.6:** In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml und 100 µg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O	300 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml	25 µg/ml und 50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml und 50 µg/ml

## 2.9 Weitere Medienzusätze

Tab. 2.7: Weitere Medienzusätze, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ammoniumchlorid	3 M	18 mM
Calciumchlorid	1 M	
Glucose	20 %, sterilfiltriert	1 mM und 22,2 mM
$\gamma$ -Glutamylhydrazid	0,2 M	2 mM
IPTG	0,1 M in dH <sub>2</sub> O	0,2 mM
Magnesiumsulfat	1 M	
X-Gal	20 mg/ml in DMF	40 $\mu$ g/ml
Aminosäuren*	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Aspartat	0,1 M	10 mM
Asparagin	0,1 M	5 mM und 10 mM
Glutamat	1,2 M	0,8 mM und 5 mM
Glutamin	0,1 M	10 mM

\* alle sterilfiltriert

## 2.10 Mikroorganismen

Tab. 2.8: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen

Mikroorganismen	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i>	Stratagene Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> XL1Blue MRF'	<i>lac[F'proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)] <math>\Delta</math>(<i>mrcA</i>)183 <math>\Delta</math>(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i></i>	Stratagene Short <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> XLOLR	<i>lac[F'proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] <math>\Delta</math>(<i>mrcA</i>)183 <math>\Delta</math>(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i></i>	Stratagene
<i>E. coli</i> CU1783(BL21 $\Omega$ )	<i>lac[F'proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] Su<sup>-</sup> (nonsuppressing) <math>\lambda</math>r (lambda resistant)</i>	
<i>E. coli</i> S17-1 pOT182	Durch Insertion des $\Omega$ -Fragmentes von pMJ13 in das <i>ansB</i> -Gen führte zum Verlust der Asparaginase II Aktivität	Harms <i>et al.</i> , 1991
<i>E. coli</i> S17-1		Merriman T.R. & Lamont I.L., 1993 Simon <i>et al.</i> , 1983

Mikroorganismen	Beschreibung	Quelle
<b><i>Pseudomonas</i></b>		
<i>P. fluorescens</i>	Wildtyp; ATCC 13525	DSM
<i>P. putida</i>	Wildtyp; ATCC 12633	DSM
<i>P. putida</i> KT2440	mt-2 <i>hsdR1</i> ( $r^- m^+$ )	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1982
<i>P. putida</i> KT2440 rpoN-	rpoN-Mutante	Köhler <i>et al.</i> , 1989
<i>P. fluorescens</i> W24	Biokontrollstamm	Schulz <i>et al.</i> , 1998
<i>P. fluorescens</i> W34		Schulz <i>et al.</i> , 1998
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	Biokontrollstamm	Corbell N. <i>et al.</i> , 1995
<i>P. fluorescens</i> (GSPB 230)		GSPB
<i>P. putida</i> II232	Biokontrollstamm	Schulz <i>et al.</i> , 1998
<i>P. chlororaphis</i>	Biokontrollstamm	Schulz <i>et al.</i> , 1998
<i>P. syringae</i> syringae FF5		G.W. Sundin
<i>P. syringae</i> pv glycinea (XV16) WT		DSM
<i>P. syringae</i> pv glycinea PG 4180 N9	COR <sup>+</sup> ; CMA <sup>+</sup> ; CFA <sup>+</sup> ; ncr <sup>+</sup> ; Km <sup>r</sup>	Ullrich <i>et al.</i> , 1994
<i>P. syringae</i> pv tomato (DC 3000)		Romantschuk

## 2.11 Plasmide

**Tab. 2.9:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pBluescript SK(+)	Phagemid Klonierungsvektor; Stratagene	Stratagene
pASK-C	Derivat von pASK-75	Alting-Mees <i>et al.</i> , 1989
pBK-CMV	Phagemid Klonierungsvektor; Stratagene	Bader; 1996
λZAP Express	Klonierungsvektor	Stratagene
Tn5-OT182	Derivat von pSUP102(Gm)::Tn5-B21 (Simon <i>et al.</i> 1989)	Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992
pOT182	Vektorplasmid, trägt Tn5-OT182 „self cloning promotor probe vector“	Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992 & Short <i>et al.</i> , 1988
		Merriman & Lamont, 1993
		Merriman & Lamont, 1993

## 2.12 Oligonukleotide

**Tab. 2.10:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Alle synthetische Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt.

Bezeichnung	Strang*	Nukleotidsequenz**	Schnittstelle
AsnFor	s	5'- TGTTCGAATTTCACNGGNGGNACNATNG -3'	EcoRI
AsnBack	as	5'- TGTCCGGATCCAYNGTRTCNGTNCCRTG -3'	BamHI
PR 1	s	5'- GACCTATCAAGCGGCGAAAGTCGG -3'	---
PR 2	as	5'- TGTGTCGGTACCGTGGGTGATCAC -3'	KpnI
PSGA 1	s	5'-CGGGTGTTCTAGATGAACCTG -3'	XbaI
PSGA 2	as	5'- CGGTGAATTCAGACAGCGGG -3'	EcoRI
ADA 1		5'- CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCG GCCGCCCGGGCAGGT -3'	---
ADA 2		5'-ACCTGCCC-NH <sub>2</sub> - 3'	---
ADP		5'- CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC -3'	---
GSP 2	as	5'- TACTCGGCGACCCAACACTGCAGAAGGT -3'	PstI
GSP 3	as	5'- GCTCTAGAATCACCACGTTGGCCAG -3'	XbaI
GSP 4	as	5'- TGGAATATTCATGCAGGCGTG -3	SspI

\* as = antisense; s = sense

\*\* N = ACGT; R = AG; Y = CT

Restriktionsschnittstellen sind grau unterlegt

### 3 Methoden

#### 3.6 Isolierung von genomischer DNA aus *Pseudomonas*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Pseudomonas* wurde eine modifizierte Methode nach Birnboim & Doly [Birnboim & Doly, 1979] angewandt. Sie beruht auf alkalischer Lyse der Zellen, sowie auf der Reinigung der DNA durch Adsorption an Anionentauschersäulen. Abhängig davon, wieviel DNA benötigt wurde, wurden 2 verschiedene Systeme verwendet.

Für größere Mengen wurden Qiagentip/G-Anionentauschersäulen (Qiagen) verwendet. 20 ml Übernachtskultur ( $1,3 \times 10^{10}$  Zellen) wurden abzentrifugiert und in 11 ml Puffer B1, der 200 µg/ml RNase A enthielt, resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysozym (100 mg/ml) und 500 µl Proteinase-K (20 mg/ml) wurde mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert, solange, bis die Lösung homogen war. Durch diese Inkubation wurden die Zellen durch Lysozym und durch die Detergentien, die im Puffer B1 enthalten sind, vollständig lysiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer B2 und vorsichtigem Invertieren des Reaktionsgefäßes, wurde das Lysat ca. 30 - 60 min bei 50 °C inkubiert, bis es vollständig klar war. Durch die Inkubation in Puffer B2 wird die DNA vollständig von Proteinen befreit. Nachdem die Genomic tip500/G-Säule mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden war, wurde das Lysat aufgetragen. Falls das Lysat zu viskös war, wurde es mit bis zu 10 Volumen QBT-Puffer versetzt und auf maximaler Stufe kurz gevortext, bevor es auf die Anionentauscher-Säule aufgetragen wurde. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zweimal mit 15 ml QC-Puffer gewaschen. Die genomische DNA wurde mit 15 ml QF eluiert und durch Zugabe von 0,7 Volumen 100 % Isopropanol gefällt. Nachdem die DNA durch Zentrifugation bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert worden ist, wurde sie zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen und bei 55 °C 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

<b>Puffer B1</b>	50	mM	EDTA
	50	mM	Tris/HCl
	0,5	%	Tween-20
	0,5	%	Triton X-100
			pH 8,0

<b>Puffer B2</b>	3	M	GuHCl
	20	%	Tween-20 pH 5,5
<b>Puffer QBT</b>	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS
	15	%	Ethanol
	0,15	%	Triton X-100 pH 7,0
<b>Puffer QC</b>		1,0	M NaCl
	50	mM	MOPS
	15	%	Ethanol pH 7,0
<b>Puffer QF</b>		1,25	M NaCl
	50	mM	Tris/HCl
	15	%	Ethanol pH 8,5
<b>TE-Puffer</b>	10	mM	Tris/HCl
	1	mM	EDTA pH 8,0

Für kleinere DNA-Mengen wurden kleine zentrifugierbare Anionentauschersäulen (QIAamp Tissue Kit; DNeasy Kit) der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde 1,5 ml *Pseudomonas* Übernachtskultur 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg/ml), wurde die Suspension solange bei 55 °C inkubiert, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Danach wurden 20 µl RNaseA-Lösung (20 mg/ml) zugegeben, gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer AL und erneutem Mischen wurde 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl 100 % Ethanol zugegeben, gemischt, die Lösung auf eine Spin - Säule aufgetragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gestellt. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl AW-Puffer gewaschen. Zum Eluieren der DNA wurden zweimal jeweils 200 µl vorgewärmter Puffer AE (70 °C) auf die Säule aufgetragen, 1 min inkubiert und zentrifugiert.



### 3.7 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden Qiagen-Mini-Spin-Säulen verwendet (QIAprep Spin Plasmid Kit) verwendet. Die Prozedur basiert ebenfalls auf einer modifizierten Methode nach Birnboim & Doly [Birnboim & Doly, 1979] und auf der Adsorption von DNA an Silicagel unter „Hochsalz“-Bedingungen [Vogelstein & Gillespie, 1979].

1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Puffer P1, der 0,7 mg/ml RNaseA enthielt, resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und vorsichtig gemischt, bis die Lösung klar und viskos war. Die Proteine wurden durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 und sofortigen Invertieren ausgefällt und 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Durch die hohe Salzkonzentration werden nicht nur die Proteine, sondern auch die chromosomale DNA und Zellbruchstücke denaturiert und durch SDS ausgefällt. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert dagegen und verbleibt im Überstand. Der Überstand wurde auf eine Qiagen-Spin-Säule gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule gewaschen. Dazu wurden erst 0,5 ml PB-Puffer aufgetragen und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 0,75 ml PE-Puffer aufgetragen und erneut bei 10000 rpm zentrifugiert. Um noch vorhandene Ethanolreste des PE-Puffers zu entfernen, wurde 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der Plasmide wurden 30 - 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 auf die Säulen gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

### 3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Fragmente amplifiziert werden [Saiki *et al.*, 1988]. Dazu werden zwei synthetische Oligonukleotidprimer benötigt, die jeweils komplementär zu dem 3'- und dem 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sind. Die Elongation dieser Primer wird durch die *Taq*-DNA-Polymerase katalysiert. Die *Taq*-DNA-Polymerase ist eine hitzestabile DNA-Polymerase, die aus dem in heißen Quellen lebendem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Sie besitzt eine optimale Amplifizierungstemperatur von 72 °C. Nach dem Ansetzen der PCR wurde die

Template-DNA zunächst bei 94 °C hitzedenaturiert. Die anschließende Abkühlung des Gemisches auf eine für die eingesetzten Oligonukleotide berechnete Hybridisierungstemperatur, die zwischen 40 °C und 65 °C lag, ermöglicht den Oligonukleotiden sich an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize anzulagern. Nach der Anlagerung dienen die Oligonukleotide als Primer für die DNA-Polymerase, die die Primer in 5'→3'-Richtung verlängert. Die auf diese Weise neu entstehenden DNA-Doppelstränge werden erneut bei 94 °C denaturiert, wieder mit den Primern hybridisiert und die DNA-Polymerase-Reaktion wiederholt. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Kettenverlängerung kann mit einem programmgesteuerten Thermocycler bis zu 50 mal wiederholt werden. Dabei verdoppelt sich theoretisch bei jedem Zyklus die Menge des gewünschten DNA-Fragments [Mullis & Faloona, 1987].

Alle bei dieser Arbeit durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen wurden in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Neben der *Taq*-DNA-Polymerase (peqlab, Erlangen) wurde noch die „Long PCR System“-Polymerase (peqlab) und die *Pfu*-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Die „Long PCR System“ Polymerase ist besonders für die Amplifizierung langer DNA-Fragmente, sowie für eine hohe Produktausbeute geeignet. Sie besitzt ein Temperaturoptimum von 68 °C. Die *Pfu*-Polymerase, die aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* gewonnen wird, ist thermostabiler als die *Taq*-Polymerase, und hat eine geringere Fehlerrate. Außerdem besitzt sie eine korrekturlesende 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Sie wurde eingesetzt, wenn eine besonders hohe Genauigkeit oder glatte Enden bei den Amplifikaten erforderlich waren.

Alle durchgeführten PCRs wurden als „Hot Start“-PCR durchgeführt. Das bedeutet, daß der Reaktionsansatz ohne Polymerase in einen auf 94 °C vortemperierten Thermocycler gestellt wurde, und die DNA-Polymerase erst während einer initialen Denaturierung von zwei Minuten zugegeben wurde. Dadurch wurden unspezifische Hybridisierungs- und Amplifizierungsereignisse verhindert. Nach dem letzten Zyklus wurden die PCR-Ansätze noch 5-8 Minuten bei 72 °C (bzw. 68 °C) gehalten, um noch nicht vollständig amplifizierte DNA-Fragmente fertigzustellen.

Reaktionsansätze(100 µl)	
Template-DNA	0,1 - 1 µg
Oligonukleotide	1 µM
10 x Puffer	10 µl
dNTPs	200 - 300 µM
MgCl <sub>2</sub>	1,25 mM
-----	
<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 Units
<i>Pfu</i> -Polymerase	5 Units
„Long PCR System“-Polymerase	2,5 Units

### 3.9 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von ds-DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen des Typs II. Diese Enzyme erkennen und hydrolysieren palindrome Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen. Dabei entstehen an den 3'-Enden des gespaltenen DNA-Doppelstranges Hydroxylgruppen, während die 5'-Enden Phosphatgruppen tragen. Je nachdem, welches Enzym verwendet worden ist, entstanden bei einer Restriktion glatte („blunt“) oder versetzte („sticky“) Enden. Die Aktivität der Restriktionsenzyme wird folgendermaßen definiert: Ein Unit eines Enzyms ist diejenige Menge des Enzyms, die ausreicht, um 1 µg λ-DNA bei 37°C in 1 h vollständig zu schneiden. Aufgrund dieser Definition konnte die benötigte Menge an Enzym anhand der zu spaltenden DNA-Menge berechnet werden. Für eine hydrolytische Spaltung wurden zwischen 50 ng (analytischer Restriktion) und 4 µg (präparative Restriktion) DNA mit der entsprechenden Menge Enzym und 1/10 Volumen an 10x-Reaktionspuffer versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf das Endvolumen aufgefüllt. Analytische Restriktionen wurden mindestens 1 h, präparative Restriktionen mehrere Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurden PCR-Fragmente geschnitten, so mußten die Restriktionsansätze mindestens 20 h inkubiert werden, da die durch die PCR-Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen an den Enden der PCR-Fragmente lokalisiert waren. Weil es für Restriktionsendonukleasen schwierig ist an die Enden von DNA-Fragmenten zu

gelangen und dort zu schneiden, mußten die Ansätze länger inkubiert werden, um eine möglichst vollständige Restriktion zu erreichen.

### **3.10 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen**

Um zu verhindern, daß mit nur einer Restriktionsendonuklease gespaltene Vektor-DNA wieder mit sich selbst ligierte, wurden die geschnittenen Vektoren mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse endständiger 5'-Phosphatgruppen von linearen DNA-Molekülen. Da die T4-DNA-Ligase nur DNA-Fragmente verbindet, die am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen, konnte durch die Dephosphorylierung der Vektoren die Ausbeute an rekombinanten Plasmiden bei der Ligation verbessert werden. Die Dephosphorylierung wurde direkt im Anschluß an eine Restriktion in dem Restriktionsansatz durchgeführt.

Für die Durchführung wurde zu einem Restriktionsansatz 0,1 Unit CIP gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

### **3.11 DNA-Ligation**

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente zu einem durchgehenden Doppelstrang verknüpft. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase in Anwesenheit von ATP die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen.

Für eine Ligation wurden 50-200 ng Vektor-DNA mit der dreifachen Menge an DNA-Fragment, 1/5 Volumen 5x-Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Unit/µl) versetzt. Abhängig davon, mit welchem Restriktionsenzym geschnitten worden war, wurde bei 4 °C, 16 °C oder RT über Nacht inkubiert.

### 3.12 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können analytisch oder präparativ durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle von der Kathode zur Anode. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, enthalten die Agarosegele Ethidiumbromid, das sich zwischen GC-Basenpaaren der DNA einlagert und so einen Komplex bildet, der unter UV-Licht sichtbar ist.

Normalerweise wurden 0,8 - 1,2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung dieser Gele wurde die Agarose mit 1x TB-Puffer aufgekocht und die Lösung mit einer 1 %igen (w/v) Ethidiumbromidlösung auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml gebracht. Nach Abkühlung auf unter 50 °C wurde die Gellösung in eine Flachbettapparatur gegossen, in die zuvor ein Probenkamm befestigt worden war. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit 1x TB-Puffer überschichtet und der Probenkamm vorsichtig herausgezogen. Dadurch entstanden 4 mm breite Proben-taschen, in die maximal 20 µl DNA-Lösung gefüllt werden konnten. Bevor die DNA-Proben aufgetragen werden konnten, mußten sie noch im Verhältnis 5:1 mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt werden. Durch diesen Puffer wurde die Dichte der DNA-Lösung erhöht, so daß diese leicht in die Taschen pipettiert werden konnte. Außerdem enthält der 6x Puffer noch Farbmaler, durch die der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden konnte. Die Farbmaler, Bromphenolblau und Xylencyanol, besitzen eine elektrophoretische Beweglichkeit, die der von 300 bp- und 4000 bp DNA-Fragmenten entspricht. [Sambrook *et al.*, 1989]

Als Größenstandard diente mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittene  $\lambda$ -DNA oder DNA-Gemische, die Fragmente im Bereich zwischen 100 bp und 23 kb enthielten. Die Gelelektrophorese wurde bei 3-5 V / cm durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe unter kurzzeitigem UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden, da die durch das UV-Licht angeregten Komplexe im sichtbaren Licht bei 590 nm im Orangeroten fluoreszierten. Die Gele wurden mit einer Videokamera mit Orangefilter, oder mit einer KODAK DC120 Kamera fotografiert. Für die Präparation von bestimmten DNA-Fragmenten wurden präparative Gele hergestellt. Dazu wurden jeweils mehrere Zähne des Probenkammes abgeklebt, so daß Proben-taschen entstanden, in die bis zu 50 µl DNA-Lösung aufgetragen werden konnten. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die DNA-

Fragmente, um größere durch UV-Licht ausgelöste DNA-Schäden zu vermeiden, unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Gel herausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. (siehe Präparation von DNA aus Agarosegelen)

#### **10x TB-Puffer**

Tris-Base	900	mM
Borsäure	900	mM

#### **Ethidiumbromidlösung**

Ethidiumbromid	1 %	(w/v)
----------------	-----	-------

#### **1x TB-Puffer**

10x TB-Puffer	100	ml
dH <sub>2</sub> O	900	ml

#### **6x DNA-Probenpuffer**

Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
Xylen-Cyanol	0,25	% (w/v)
Ficoll-400	15	% (w/v)

(oder von Firmen zu den Markern mitgelieferte Puffer)

### **3.13 Ethidiumbromid-Färbung von Agarosegelen**

Zur nachträglichen Ethidiumbromid-Färbung von Agarosegelen wurden die Gele 30 - 45 min in 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, inkubiert.

### **3.14 Präparation von DNA aus Agarosegelen**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht von 365 nm möglichst knapp aus dem Gel geschnitten, mit 3 Volumen QG-Puffer versetzt und bei 50 - 56 °C solange inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hatte. Dabei wurde alle 2 - 3 min gemischt. Nachdem das Gel vollständig gelöst war, mußte die Farbe der Lösung gelb sein, da der Puffer QG einen Farbindikator enthielt. Bei pH-Werten, die über 7,5 liegen, färbt der

Indikator die Lösung orange bis violett. In dem Fall mußte die Lösung mit 10 µl 3 M Natriumacetat auf ein pH von 7,5 oder kleiner eingestellt werden. Nach Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol wurde die Lösung auf eine Spin-Säule (Qiagen) aufgetragen und 1 min in einer Microzentrifuge bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde mit QG- und PE-Puffer gewaschen. Dazu wurden zunächst 0,5 ml QG-Puffer aufgetragen und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. danach wurden 0,75 ml PE-Puffer aufgetragen und erneut bei 10000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung noch vorhandener Ethanol-Reste wurde anschließend noch einmal 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die DNA mit 30-50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, oder sterilem dH<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.15 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Kompetente Bakterienzellen besitzen die Fähigkeit, Fremd-DNA effizient aufzunehmen. Dazu werden die Zellen mit hochkonzentrierten Salzlösungen behandelt, so daß die Plasmamembran der Zellen unter bestimmten Bedingungen für die DNA-Aufnahme durchlässig wird. Es gibt verschiedene Möglichkeiten *E. coli*-Zellen kompetent zu machen. Bei der einen Methode wird CaCl<sub>2</sub> bei der anderen RbCl verwendet. RbCl-kompetente Zellen haben den Vorteil, daß sie in relativ kurzer Zeit hergestellt werden und dann bei - 80 °C gelagert werden können. Auf diese Weise können größere Mengen kompetenter Zellen hergestellt werden, die dann je nach Bedarf verwendet werden können. Außerdem zeigen mit RbCl behandelte Zellen oft eine bessere Aufnahmefähigkeit von DNA).

#### **3.15.1 Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen**

200 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen worden war, wurden die Zellen vorsichtig in 4 °C kaltem TFB 1-Puffer resuspendiert (30 ml TFB 1 / 100 ml Kultur) und 90 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 5 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand

wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen vorsichtig in eiskaltem TFB 2-Puffer resuspendiert (4 ml / 100 ml Kultur). Die Zellen wurden in 400 µl Aliquots aufgeteilt, für einige Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

#### **TFB 1-Puffer**

(sterilfiltriert)

Rubidiumchlorid	100	mM
Manganchlorid	50	mM
Kaliumacetat	30	mM
Calciumchlorid	10	mM
Glycerin	15	%
	pH 5,8	

#### **TFB 2-Puffer**

(autoklaviert)

MOPS	10	mM
Rubidiumchlorid	10	mM
Calciumchlorid	75	mM
Glycerin	15	%
	pH 8,0	

### **3.16 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen**

Bei der Transformation werden Plasmide in kompetente Zellen übertragen. Plasmide werden auch als Autosomen bezeichnet, da sie sich in einer geeigneten Wirtszelle autonom replizieren können. Bei der Transformation wird die zu den kompetenten Bakterienzellen gegebene DNA als Doppelstrang an die Zellmembran gebunden. Nachdem einer der beiden Stränge durch membrangebundene Nukleasen abgebaut worden ist, wird die DNA während eines Hitzeschocks als Einzelstrang von der Zelle aufgenommen.

200 µl RbCl-kompetente *E. coli*-Zellen wurden zu einem Ligationsansatz gegeben und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Während eines nachfolgenden zweiminütigen Hitzeschocks bei 42 °C fand die eigentliche DNA-Aufnahme statt. Danach wurden die Zellen mit 0,5 ml LB-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, in höchstens 100 µl des Überstandes wieder



resuspendiert und auf LB-Agarplatten, die entsprechende Zusätze (Antibiotika, IPTG, X-Gal, etc.) enthielten, ausplattiert. Nur die Zellen, die Plasmid-DNA aufgenommen hatten, trugen die Resistenz gegen die in den Agarplatten enthaltenen Antibiotika und wuchsen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C zu einer Einzelkolonie heran.

### 3.17 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger [Sanger *et al.*, 1977]. Bei dieser Methode wird ein Oligonukleotid, das komplementär zu einem bestimmten Bereich einer gegebenen einzelsträngigen DNA ist, an diese angelagert und dient dort als Primer. Ausgehend von diesem Primer synthetisiert die DNA-Polymerase in vier verschiedenen Reaktionsansätzen, in Gegenwart von radioaktiv markierten [ $\alpha^{35}\text{S}$ ] dATP und einem Gemisch aus den drei anderen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), den zu der vorgegebenen DNA-Matrize komplementären DNA-Strang. Durch Zugabe von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs) wird die DNA-Synthese abgebrochen, sobald ein ddNTP eingebaut wird, da der DNA-Polymerase die 3'-Hydroxylgruppe für die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung fehlt. Wird jeweils ein Didesoxyanalogon einer Base, in geringerer Konzentration als die dNTPs, zu einem Ansatz gegeben, erhält man durch statistisch verteilte Kettenabbrüche unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Jeder der vier Ansätze wird dann auf einem denaturierenden, hochauflösenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Autoradiographie können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und so die Sequenz der vorgegebenen DNA bestimmt werden.

#### 3.17.1 Denaturierung

Zur Denaturierung wurden 8 µl Plasmidlösung (ca. 1,5 µg) mit 2 µl 2 M Natronlauge versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisation wurde die denaturierte DNA mit 3 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Nach Zugabe von 7 µl dH<sub>2</sub>O wurde die DNA mit 60 µl 100 %igem kaltem Ethanol versetzt und in flüssigem Stickstoff gefällt. Nachdem die DNA durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 4 °C abgetrennt worden war, wurde

das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.17.2 Hybridisierung des Primers

7 µl denaturierte DNA wurden mit 2 µl 5x Sequenase-Puffer und 1 µl des Primers versetzt und 2 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in dem Wasserbad langsam, über einen Zeitraum von mindestens 30 min, auf unter 30 °C abgekühlt. Danach wurde das Gemisch bis zur Verwendung auf Eis gestellt oder bei - 20 °C gelagert.

#### 5x Sequenase-Puffer

Tris/HCl, pH 7,5	200	mM
Magnesiumchlorid	100	mM
Natriumchlorid	250	mM

### 3.17.3 Kettenverlängerung

Zu 10 µl Hybridisierungsgemisch wurden 1 µl 0,1 M DDT, 2 µl des 1x Labeling-Mix, 0,5 µl [ $\alpha$  <sup>35</sup>S] dATP und 2 µl verdünnte DNA-Polymerase pipettiert und 2-5 min bei RT inkubiert.

#### 5x Labeling-Mix

dCTP, dGTP, dTTP	je	7,5	µM
------------------	----	-----	----

#### Enzymverdünnungspuffer

Tris / HCl, pH 7,5	10	mM
DTT	5	mM
BSA	0,5	mg/ml

#### Phosphatase

Tris/HCl, pH 7,5	10	mM
Pyrophosphatase	5	U/ml
EDTA	0,1	mM
Glycerin	50	%

**Sequenase Version 2.0**

Kaliumphosphat, pH 7,4	20	mM
Sequenase (DNA-Polymerase)	13	u/μl
DTT	1	mM
EDTA	0,1	mM
Glycerin	50	%

**verdünnte DNA-Polymerase-Lösung**

Enzymverdünnungspuffer	1,625	μl
Pyrophosphatase	0,125	μl
Sequenase Version 2.0.	0,25	μl

**3.17.4 Kettenabbruchreaktion**

In vier Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde jeweils 2,5 μl eines Didesoxynukleotid-Terminationsgemisches gegeben und bei 37°C vorinkubiert. Jeweils 3,5 μl des Kettenverlängerungsansatzes wurde zu dem Terminationsgemisch pipettiert und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Kettenabbruchreaktion wurde durch Zugabe von 4 μl Stopplösung zu jedem der 4 Ansätze gestoppt. Zur Lagerung konnten die Proben bis zu drei Monaten bei - 20°C eingefroren werden. Bevor die Proben auf einem Sequenzgel aufgetragen wurden, mußten sie noch 2 min bei 75 °C denaturiert werden.

**ddA-Terminations-Mix**

Natriumchlorid	50	mM
ddATP	8	mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP je	80	mM

**ddC-Terminations-Mix**

Natriumchlorid	50	mM
ddCTP	8	mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP je	80	mM

**ddG-Terminations-Mix**

Natriumchlorid	50	mM
ddGTP	8	mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP je	80	mM

**ddT-Terminations-Mix**

Natriumchlorid	50	mM
ddTTP	8	mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP je	80	mM

**Stop-Lösung**

Formamid	95	%
EDTA	20	mM
Bromphenolblau	0,05%	(w/v)
Xylen-Cyanol	0,05%	(w/v)

**3.18 Hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die bei der Sequenzierungsreaktion entstandenen DNA-Fragmente wurden auf einem denaturierenden, hochauflösenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Zunächst wurden zwei Glasplatten der Größe 34 x 42 cm<sup>2</sup> und 34 x 44 cm<sup>2</sup> mit dH<sub>2</sub>O und Ethanol gründlich gereinigt. Auf die größere der beiden Platten wird eine Bindsilanlösung, auf die kleinere eine Trennsilanlösung aufgetragen und 30 min einwirken gelassen. Durch diese Behandlung bleibt, nach Abschluß der Elektrophorese, das Gel an der größeren Platte haften. Um überschüssige Binde- und Trennsilanlösung zu entfernen, wurden die Platten erneut mit dH<sub>2</sub>O und Ethanol gereinigt. Auf die große Platte wurden dann drei ca. 2 cm breite Whatman-3MM-Papierstreifen so aneinandergelegt, daß sie mit den Rändern der Glasplatte abschlossen und sich keine Zwischenräume zwischen ihnen befanden. Die kleine Platte wurde dann so auf die große gelegt, daß sich die Papierstreifen nicht gegeneinander verschoben. Nachdem die Platten mit Spannklemmen zusammengeklammert worden waren, konnte die frisch angesetzte, noch warme Harnstoff-Acrylamid-Lösung durch die offene Seite zwischen die Platten gegossen werden. Anschließend wurden zwei Haifischzahnkämme mit ihrer glatten Seite 1-2 mm in das Gel gesteckt und mit Spannklemmen fixiert. Das Gel polymerisierte über Nacht vollständig aus und wurde dann in eine „S2“-Elektrophoresekammer (Life Technologies) eingespannt. Nachdem 0,8x TTE in die Pufferreservoirs gefüllt wurde, konnten die Kämme vorsichtig aus dem Gel gezogen werden. Um die Geloberfläche von überschüssigen Gelresten zu befreien, wurde sie mit Hilfe einer Spritze mehrmals mit Puffer gespült. Danach wurden die Kämme so in das

Gel gesteckt, daß die Zähne 1-2 mm in das Gel hineinragten. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde das Gel ungefähr 30 - 45 min bei 60 W (ca. 1700 V) vorgewärmt. Direkt vor dem Auftragen der Proben wurden die Probentaschen mit 0,8x TTE-Puffer gespült. Nach zweiminütiger Denaturierung bei 75°C wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte zwischen 4 und 8 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und die beiden Glasscheiben vorsichtig voneinander getrennt. Dabei blieb das Gel an der größeren, mit Bindsilan behandelten Platte haften. Das Gel wurde 15-30 min fixiert und danach der Harnstoff unter fließendem Wasser aus dem Gel gewaschen. Nachdem das Gel bei 80 °C getrocknet worden war, wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und bei RT über Nacht exponiert.

#### **40 %ige Acrylamid-Lösung**

Bisacrylamid	2	% (w/v)
Acrylamid	38	% (w/v)

#### **20x TTE-Puffer**

Tris-Base	216	g
Taurin	72	g
EDTA(Di-Natrium-Salz)	4	g
dH <sub>2</sub> O	ad	1
(filtrieren, autoklavieren)		

#### **0,8x TTE-Puffer**

20x TTE-Puffer	80	ml
dH <sub>2</sub> O	1920	ml

#### **Bindsilan-Lösung**

100 % Ethanol	25	ml
10 % Essigsäure	750	µl
Methylacryl-oxy-propyl trimethylsilan	5	µl

#### **Trennsilan-Lösung**

5 % (v/v) Dichlordimethylsilan in CHCl<sub>3</sub>

**Acrylamidgel-Lösung**

Harnstoff	50	g
20x TTE-Puffer	4	ml
38 %ige Acrylamidlösung		
2 %ige Bisacrylamidlösung	15	ml
dH <sub>2</sub> O	add 100	ml
TEMED (Radikalstarter)	25	µl
APS-Lösung, 10 % (w/v)	550	µl

**Fixierer**

Methanol	10	% (v/v)
Essigsäure	10	% (v/v)
dH <sub>2</sub> O	80	% (v/v)

Zusätzlich wurden Sequenzierungen bei der Firma Toplab GmbH (Martinsried) in Auftrag gegeben.

**3.19 Konstruktion einer  $\lambda$ -ZAP-Express Genbank**

Eine Genbank oder Genombibliothek ist eine statistische Präsentation der Gesamt-DNA eines Organismus durch relativ kleine, DNA-Fragmente tragende Klone. Als Gesamt-DNA kann genomische DNA oder cDNA verwendet werden. Die DNA-Fragmente können entweder in Plasmiden vorliegen, die in Bakterienzellen transformiert werden, oder in Bakteriophagen-DNA kloniert sein, die sich durch Infektion in Bakterienzellen einschleusen läßt. Wichtig ist ein ausreichender Titer der Genbank, d.h. die ursprüngliche Gesamt-DNA muß durch die Summe der einzelnen DNA-Fragmente komplett, möglichst mehrmals und statistisch einander überlagernd, wiedergegeben werden können. Dann läßt sich ein beliebiger DNA-Abschnitt aus der Genbank isolieren und bearbeiten.

Die verschiedenen Genbanksysteme unterscheiden sich hauptsächlich in der Größe der eingebauten DNA-Inserts. Zur Identifizierung des Asparaginase-Gens aus *P. fluorescens*, dessen Größe aufgrund der bekannten Proteinsequenz der *Pseudomonas* sp. 7A Glutaminase-Asparaginase (PGA) und der bekannten *E. coli* Asparaginase II auf ca. 1,3 – 1,5 kb geschätzt wurde, wurde das ZAP-Express Genbank-System gewählt. Obwohl der ZAP-Express Vektor nur DNA-Fragmente von maximal 9

- 12 kb aufnehmen kann, besitzt er den Vorteil, daß die gewünschten Inserts durch eine „*in vivo excision*“ direkt, ohne Phagenisolierung und Umklonierung, in ein Plasmid subkloniert werden können.

### 3.19.1 Partielle Restriktion von genomischer DNA aus *P. fluorescens*

Zur Konstruktion der Genbank mußte die chromosomale DNA statistisch in Fragmente der gewünschten Größe geschnitten werden. Das wird durch partielle Restriktion mit einer Endonuklease erreicht, die eine Tetranukleotid-Erkennungssequenz besitzt. Endonukleasen mit Tetranukleotid-Erkennungssequenzen schneiden sehr oft und eignen sich deshalb zur statistischen Restriktion. Durch eine Verdünnungsreihe der Enzymkonzentration bei gleicher DNA-Menge kann eine DNA-Fraktion hergestellt werden, die Fragmente der gewünschten Größe enthält. Zur partiellen Restriktion wurde *Sau3AI* verwendet, das komplementäre Enden zu den mit *BamHI* vorbehandelten ZAP-Express-Vektorarmen bildet. Dadurch wurde eine Ligation der statistisch geschnittenen DNA mit den Phagenarmen möglich.

317 µg genomische DNA von *P. fluorescens* (800 µl) wurden mit 2 ml 1 x Restriktionspuffer gemischt und auf sieben 400 µl Aliquots aufgeteilt. Nach Zugabe von 1 µl *Sau3AI* (10 Units/µl) zum ersten Aliquot und Mischen wurden 150 µl in das nächste Aliquot pipettiert, wieder gemischt und wieder 150 µl auf das nächste Aliquot pipettiert usw. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C, wurde das Enzym durch 15 minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Von jedem Aliquot wurden 10 µl für ein Agarosegel abgenommen. Zu den ursprünglichen Aliquots wurden jeweils 2 µl alkalische Phosphatase (CIP) gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde der Ansatz 15 min bei 68 °C erhitzt und die Aliquots anschließend auf Eis gestellt.

Die statistische Restriktion wurde durch Elektrophorese (5 h bei 50 mA auf Eis) auf einem 0,5 %igem Agarosegel überprüft und diejenigen Ansätze, die DNA im Bereich von 9 - 12 kb enthielten, einer genaueren Größenfraktionierung unterzogen.

### 3.19.2 Dichtegradientenzentrifugation

(ohne Ethidiumbromid-Färbung)

Da die Ansätze der partiellen Restriktion außer den gewünschten DNA-Fragmenten auch noch viele kleinere Fragmente enthielten, die aber nicht mit den Phagenarmen ligiert werden sollten, mußte noch eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt werden.

Die Dichtegradientenzentrifugation dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Dabei ordnen sich die verschieden großen DNA-Fragmente während der Zentrifugation entsprechend ihrer Größe in dem Gradienten an. Der Gradient wurde aus einer 5 %igen und einer 30 %igen NaCl-Lösung mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer peristaltischen Pumpe in einem Zentrifugenröhrchen hergestellt. Die zu trennende DNA-Lösung wurde vorsichtig oben auf den Gradienten pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte 4,5 h bei 37000 rpm in einer Ultrazentrifuge. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden von oben vorsichtig 500 µl Aliquots abpipetiert, gegen TE-Puffer dialysiert (Tropfendialyse) und auf einem 0,5 % igen Agarosegel analysiert.

#### 5% ige NaCl-Lösung

NaCl	15 %	(w/v)
EDTA	3	mM
		pH 8,0

#### 30 %ige NaCl-Lösung

NaCl	30 %	(w/v)
EDTA	3	mM
		pH 8,0

### 3.19.3 Tropfendialyse und DNA-Fällung

Zur Dialyse kleiner Probenvolumina (bis zu 150 µl) wurde die sogenannte Tropfendialyse verwendet. Dazu wurden sterile Petrischalen mit sterilem TE-Puffer gefüllt. Pro Schale wurden dann vorsichtig 2 MF-Membranfilter (Millipore) aus Zellulosemischester auf den Puffer gelegt. Pro Filter wurden vorsichtig 150 µl Probe mit einer Pipette



aufgetragen, die Schalen abgedeckt und 20 - 30 min stehengelassen. Danach wurden die dialysierten Proben vorsichtig von den Filtern abgenommen und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Überschritt das Probenvolumen 150 µl, so konnte die gleiche Probe erneut auf den Filter aufgetragen werden.

Jede dialysierte Fraktion wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,5 und 2,5 Volumen 100 % Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurde die DNA pelletiert. Die DNA-Pellets wurden zweimal mit 70 % Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in 10 µl sterilem dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Durch Agarosegelelektrophorese auf einem 0,5 %igem Gel konnte die Fraktionierung überprüft werden.

#### **3.19.4 Ligation mit dem ZAP-Express-Vektor**

Um Mehrfach-Insertionen zu vermeiden wurden die DNA-Fragmente im gleichen oder geringerem molaren Verhältnis wie die Vektorarme eingesetzt.

Zur Ligation der DNA-Fragmente mit den Phagenarmen wurden 1 µl mit *Bam*HI behandelter ZAP-Express Vektor (1 µg/µl) mit 1,5 µl DNA-Fragmenten, 0,5 µl 10 x Ligase Puffer, 0,5 µl 10 mM rATP und 1,5 µl dH<sub>2</sub>O versetzt, gemischt und 2 µl (1 U/µl) T4-DNA-Ligase zugefügt. Die Ligation wurde über Nacht in einem Wasserbad bei 14 °C durchgeführt.

#### **3.19.5 Verpackung der Ligationsansätze**

(Verpackung in Phagenpartikel)

4 µl Ligationsansatz wurden auf Eis zu dem „Freeze-thaw“-Extrakt (Stratagene) gegeben und mit 15 µl Ultraschallextrakt (Stratagene) versetzt und vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Dabei durften keine Luftblasen entstehen. Die Mischung wurde kurz abzentrifugiert und 2 h bei 22 °C inkubiert. Danach wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl CHCl<sub>3</sub> zugegeben, vorsichtig gemischt, um noch vorhandenen zelluläre Bruchstücke abzutrennen, kurz zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde diese Phagenlösung bei 4 °C gelagert.

**SM-Puffer**

NaCl	5,8	g
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	2,0	g
1 M Tris/HCl (pH 7,5)	50,0	ml
2 % (w/v) Gelatine	5,0	ml
add dH <sub>2</sub> O auf	1	l

**3.20 Titerbestimmung der Genbank**

50 ml LB-Maltose-MgSO<sub>4</sub>-Medium (0,2 % Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) wurden mit einer Einzelkolonie *E. coli* XL1Blue MRF' angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde frisches LB-Maltose-MgSO<sub>4</sub>-Medium 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 inkubiert. Mit frischen LB-Medium wurden die Zellen dann auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 verdünnt. Von der Genbank wurden folgende Verdünnungen in SM-Puffer hergestellt: 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000. Je 200 µl der *E. coli* XL1Blue MRF'-Zellen (OD<sub>600</sub> = 0,5) wurden mit jeweils 1 µl der einzelnen Genbank-Verdünnungen versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml NZY Top Agar (48 °C) wurde auf vorgewärmten (37 °C) NZY-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung des Titers (pfu/ml) wurden die Plaques auf den einzelnen Platten gezählt.

**3.21 Herstellung einer Asparaginase-Sonde zum Screenen der Genbank**

Zur Identifizierung eines Gens in einer Genbank benötigt man eine sogenannte DNA-Sonde für das gesuchte Gen. Als Sonden können Teilstücke von Genen, die das gleiche Protein in anderen Organismen kodieren, eingesetzt werden. Allerdings ist es besser, man verwendet DNA-Fragmente aus demselben Organismus, da dann die Wahrscheinlichkeit, daß richtige Gen zu finden deutlich größer ist. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden sich Gene aus unterschiedlichen Organismen, die das gleiche Protein kodieren, zum Teil sehr in ihren DNA-Sequenzen. Als Sonde sollte ein ca. 250 bp großes DNA-Fragment hergestellt werden, das bestimmte hochkonservierte Bereiche der periplasmatischen Asparaginase abdeckt.

Dazu wurde zunächst mit degenerierten Asparaginase-Primern PCR-Amplifizierungen mit genomischer DNA aus *P. putida* und *P. fluorescens* als Template durchgeführt. Die degenerierten Primer wurden aufgrund von Sequenzhomologien bereits bekannter Asparaginasegene verschiedener Prokaryoten erstellt. Da auch bei der Unterschiedlichkeit der DNA-Sequenzen verschiedener Organismen die Proteine immer hochkonservierte Bereiche besitzen, wurden die Primer so synthetisiert, daß sie genau in solchen hochkonservierten Bereichen lagen. Allerdings besteht bei degenerierten Primern das Problem, daß die Annaeling-Temperatur sehr niedrig gehalten werden muß, und deshalb auch unspezifische Amplifikate entstehen können. Die eingesetzten Primer AsnFor und AsnBack wurden von DNA-Sequenzen abgeleitet, die in hochkonservierten Bereichen bekannter Asparaginasen lagen und für die Aminosäuren T9-A14 und H87-M92 (*E. coli* Numerierung) kodierten.

Als Matrize wurden verschiedene Verdünnungen genomischer *P. fluorescens* DNA, die aus einer 1,5 ml Übernachtskultur präpariert wurde, eingesetzt. Zu der DNA wurden 10 pmol Forward- und 10 pmol Backward-Primer, 10 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,25 µmol MgCl<sub>2</sub> und 10 µl 10x PCR-Puffer gegeben. Mit sterilem dH<sub>2</sub>O wurde auf 100 µl aufgefüllt, 2,5 Units *Taq*-Polymerase zugegeben, mit Mineralöl überschichtet und in einen Thermocycler gestellt. Die Amplifizierung erfolgte nach 2 min Denaturierung bei 94 °C, zunächst mit 3 Cyclen bei 1,5 minütiger Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annaeling bei 44 °C und 1 min Polymerisierung bei 72 °C. Danach folgten 30 Cyclen mit jeweils 1 min 94 °C, 1 min 56 °C, 1 min 72 °C. Abschließend erfolgte noch eine 4 minütige Inkubation bei 72 °C, um noch nicht vollständig aufgefüllte DNA-Stränge fertigzustellen. Das Ergebnis der PCR wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert.

### 3.22 DIG-Markierung der Asparaginase-Sonde

Die Sonde wurde über PCR mit der DIG-Markierung versehen. Dazu wurde der „PCR DIG-Labeling MIX“ (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Der dNTP-Mix enthielt dATP, dCTP, dGTP (je 2 mM), dTTP (1,9 mM) und 0,1 mM DIG-markiertes dUTP (DIG-dUTP), das während der PCR von der Polymerase anstelle von dTTP eingebaut wird. Als Matrize diente das Plasmid 1/22. Dieses Plasmid bestand aus dem Vektor

pBluescript SK (+), der die über PCR amplifizierte Asparaginase-Sonde als Insert enthielt. Als Primer wurden die auf der Sonden-DNA-Sequenz basierenden Primer PR 1 und PR 2 eingesetzt.

PR 1: 5'- GAC CTA TCA AGC GGC GAA AGT CGG -3'

PR 2: 5'- TGT GTC GGT ACC GTG GGT GAT CAC -3'

5 µl Plasmid 1/22 wurden mit jeweils 100 pmol PR 1 und PR 2, 10 µl 10 x *Pfu*-Puffer, 5 µl DMSO, 10 µl PCR DIG-Labeling Mix in ein 0,5 ml PCR-Gefäß zusammengegeben. Mit dH<sub>2</sub>O wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt, 2,5 Units cloned *Pfu*-Polymerase (Stratagene) zugegeben und gemischt. Nachdem die Mischung kurz abzentrifugiert worden war, wurde sie mit Mineralöl überschichtet und in einen Thermocycler (Perkin Elmer) gestellt. Die Amplifizierung erfolgte nach folgenden Temperaturprofil:

Zyklen	T / °C	t / min	T / °C	t / min	T / °C	t / min
1	94	1				
5	94	1	58	1	72	1
30	94	1	64	1	72	1
1	72	4				
1	4					

### 3.23 Abschätzung der Ausbeute der DIG-Markierung der Sonde

Da man, um optimale Hybridisierungssignale zu erhalten, zum Screenen 5-25 ng/ml DIG-markierte Sonde einsetzen darf, muß nach der Markierungsreaktion der DIG-Gehalt der Sonde bestimmt werden. Dazu wird ein „Spot-Test“ mit einer markierten Kontroll-DNA, dessen DIG-Gehalt genau bekannt ist, durchgeführt.

Sowohl von der DIG-markierten Sonde, als auch von der Kontroll-DNA wird eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl und 0,1 pg/µl. Von jeder Verdünnung wird 1 µl auf ein Membranstück aufgetragen und einer Chemilumineszenz-Detektion mit CSPD unterworfen. Der direkte

Vergleich der Intensitäten der Probe und der Kontrolle erlaubt die Abschätzung der Markierungsausbeute.

### **3.24 Optimierung der Sondenkonzentration**

Da es bei zu hoher Konzentration der eingesetzten DIG-markierten Sonde zu unspezifischen Reaktionen mit der Membran kommen kann (Hintergrund-Probleme), muß vor dem eigentlichen Screening-Vorgang die Probenkonzentration optimiert werden. Dazu werden kleine Membranstücke, auf denen keine DNA transferiert wurde, in unterschiedlich konzentrierten Hybridisierungslösungen inkubiert und anschließend eine Chemiluminescens-Detektion durchgeführt. Die Sondenkonzentration, die einen akzeptablen Hintergrund gibt, wird für die Hybridisierung eingesetzt.

### **3.25 Screening der Genbank mit der DIG-markierten Asparaginase-Sonde**

Zum Screenen der Genbank wurden 50000 pfu der Genbank auf 20 NZY-Platten mit Top Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dazu wurde die entsprechende Menge der Phagenlösung mit 600 µl Wirtszellen (*E. coli* XL1Blue MRF') der OD<sub>600</sub> von 0,5 mit 6,5 ml NZY Top Agar pro Platte ausplattiert.

#### **3.25.1 Plaque Lifts**

Um die Phagen-DNA auf die Membranen zu übertragen, wurden zunächst die Plaques von den NZY Top Agar-Platten auf die Membranen übertragen. Dazu wurden die Platten 30 min bei 4 °C vorgekühlt, um zu vermeiden, daß beim späteren Abheben der Membranen von den Platten, Top Agar-Reste an den Membranen haften bleiben. Danach wurde auf jede Plattenoberfläche vorsichtig eine ungeladene Nylonmembran (QIABRANE, Qiagen) aufgelegt. Dabei dürfen weder Luftblasen entstehen, noch dürfen die Membranen nachträglich bewegt werden, da der Transfer sofort beginnt. Die Membranen wurden 1 min auf den Platten gelassen. Um später positive Klone

identifizieren zu können, wird die Orientierung der Membran auf der Platte markiert. Danach werden die Membranen vorsichtig von den Platten genommen und kurz auf trockenes Whatman 3MM Papier gelegt. Bei diesem, wie auch den folgenden Schritten zeigten die Plaque-tragende Seite der Membranen nach oben. Dann werden die Membranen auf mit Denaturierungslösung getränktes Whatman 3MM-Papier gelegt und 5 min inkubiert. Nachdem die Membranen wieder kurz auf trockenes Whatman 3MM Papier gelegt worden waren, wurden sie 15 min auf ein mit Neutralisationslösung getränktes Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Membranen wieder auf trockenes Whatman 3MM Papier gelegt und danach 10 min auf Filterpapier inkubiert, das mit 2x SSC getränkt war. Die Filter wurden dann 1-2 h auf Whatman 3MM Papier getrocknet. Durch UV-Crosslinking wurde die transferierte DNA fest auf den Membranen gebunden. Dazu wurden die Membranen mit der DNA-Seite nach unten 2 min auf einem 254 nm-UV-Transilluminator gelegt.

### **3.25.2 Proteinase K-Behandlung**

Um Hüll- und andere Proteine von den Membranen zu entfernen, wurden sie einer Proteinase-K-Behandlung unterworfen. Dazu wurden die Membranen in saubere Petrischalen gelegt und 0,5 ml einer 2 mg/ml Proteinase-K-Lösung auf die Membranen pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Schalen wurden abgedeckt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Membranen zwischen vollständig nasses (mit dH<sub>2</sub>O, steril) Filterpapier gelegt, und durch herüberrollen einer Flasche Druck ausgeübt. Die Zell- und Agarreste wurden durch vorsichtiges Abziehen des oberen Filterpapiers entfernt (Die Reste hingen an diesem Filterpapier). Falls noch Zell- oder Agarreste auf den Membranen hafteten, mußte dieser Schritt wiederholt werden.

### **3.25.3 Hybridisierung**

Die Hybridisierung wurde in Hybridisierungsflaschen (Amersham Hybridization bottles) in einem Hybridisierungsofen (MWG; München) durchgeführt. Pro Flasche wurden 3 - 4 Membranen eingesetzt. Um sicherzustellen, daß die Membranen nicht aneinanderklebten und mit genügend Hybridisierungslösung benetzt waren, wurden zwischen die Membranen Mesh-Sheets (Hybridization Mesh aus Polypropylen; Amersham)

gelegt. Nachdem die Membranen in die Rollerbottles gelegt wurden, wurden 60 - 80 ml Prähybridisierungslösung hinzugefügt und 1 - 1,5 h bei 68 °C im Hybridisierungs-Ofen inkubiert.

Die DIG-markierte doppelsträngige Sonde wurde durch 5 min Kochen bei 95 - 100 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die denaturierte Sonde wurde mit 6 ml auf 68 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung gemischt. Dabei betrug die Konzentration der DIG-Sonde in der Lösung 15 ng/ml.

Die Prähybridisierungslösung wurde aus den Flaschen entfernt und pro Flasche 6 ml Hybridisierungslösung hinzugefügt. Bei 68 °C wurde über Nacht im Hybridisierungs-Ofen inkubiert. Am Ende der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membranen in Petrischalen gelegt. Die Hybridisierungslösung wurde bei -20 °C gelagert und konnte bis zu einem Jahr verwendet werden.

#### **3.25.4 Stringente Waschschr**

Die Membranen wurden jeweils 5 min mit reichlich 2x SSC, 0,1% SDS vorsichtig bei RT gewaschen und dann zweimal für 15 min bei 68 °C in 0,5x SSC, 0,1 % SDS gewaschen.

### **3.26 Chemilumineszenz-Detektion**

(Wenn nicht extra angegeben wurden alle Detektionsschritte bei RT durchgeführt.)

Die Membranen durften zwischen den einzelnen Schritten nicht trocknen.

Nach der Hybridisierung und den Waschschr

inkubiert. Danach wurden die Membranen aus den Beuteln genommen, die überschüssige Lösung kurz abtropfen gelassen und in neue Beutel eingeschweißt. Bei RT werden ca. 7 – 8 h zum Erreichen der stationären Phase der Chemilumineszenzreaktion benötigt. Um die Reaktion zu beschleunigen wurden die eingeschweißten Membranen im Dunkeln 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein Film (BIOMAX MR; Kodak) für 30 - 60 min aufgelegt. Nach der Entwicklung des Films konnten positive Plaques identifiziert werden.

#### **Prähybridisierungslösung**

SSC	5x	
N-Lauroylsarcosin	0,1	% (w/v)
SDS	0,02	% (w/v)
Blockierungs-Reagenz	1	%

#### **Hybridisierungslösung**

wie Prähybridisierungslösung  
+ DIG-markierte Sonde

#### **Denaturierungslösung**

NaOH	0,5	M
NaCl	1,5	M

#### **Neutralisierungslösung**

Tris/HCl, pH 7,5	1,0	M
NaCl	1,5	M

#### **20 x SSC-Puffer**

NaCl	3	M
Natriumcitrat	300	mM

#### **2 x SSC-Puffer**

NaCl	0,3	M
Natriumcitrat	30	mM

#### **Proteinase-K-Lösung**

Proteinase K in 2 x SSC-Puffer	2	mg/ml
-----------------------------------	---	-------



**Waschpuffer**

Maleinsäure	100	mM
NaCl	150	mM
	pH 7,5	
Tween-20	0,3	% (v/v)

**Maleinsäurepuffer**

Maleinsäure	100	mM
NaCl	150	mM
	pH 7,5	

**Blockierungslösung**

Blockierungs-Reagenz in Maleinsäurepuffer	1	% (w/v)
--	---	---------

**Detektionspuffer**

Tris/HCl	100	mM
NaCl	100	mM
	pH 9,5	

**3.27 *In vivo* excision**

Bei der *in vivo* excision können DNA-Inserts, die in den ZAP Express Vektor kloniert worden sind, durch einen (ExAssist) Helferphagen herausgeschnitten und in pBK-CMV-Phagemide subkloniert werden [Alting-Mees *et al.*, 1992; Short *et al.*, 1988; Short *et al.*, 1992]. Dazu werden *E. coli*-Zellen mit den beim Genbankscreening erhaltenen positiven Phagen infiziert. Zusätzlich werden die *E. coli*-Zellen mit einem Helferphagen infiziert. Innerhalb der *E. coli* Zellen erkennen dann sogenannte „Trans-acting-Proteine“ des Helferphagen die Initiator- und Terminatorsequenzen des ZAP-Express-Vektors. Beide Signale werden von dem Helferphagen Gen II-Protein erkannt und ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der den zwischen dem Initiator und Terminator liegenden Strang ersetzt. Der ersetzte DNA-Strang wird dann zirkularisiert, als filamentöser Phage von den Helferphagenproteinen verpackt und von den Zellen abgegeben. Durch Infektion eines F'-Stammes mit diesem Phagen und Inkubation in Gegenwart von Kanamycin können dann die pBK-CMV-Plasmide mit den gewünschten DNA-Fragmenten erhalten werden.

Die durch Screening identifizierten positiven Plaques wurden mit einer abgeschnittenen, sterilen Pipettenspitze aus den Top Agarplatten gestochen und über Nacht bei 4 °C in 500 µl SM-Puffer und 20 µl CHCl<sub>3</sub> gelöst (= Phagenstocklösung). 3 ml LB-Maltose-MgSO<sub>4</sub>-Medium wurden mit einer Einzelkolonie *E. coli* XL1Blue MRF' angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 1000 xg abzentrifugiert und in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 resuspendiert. 200 µl dieser Zellen wurden mit 250 µl Phagenstocklösung und 1 µl ExAssist Helferphagen (Stratagene) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml NZY-Medium wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 70 °C inkubiert und dann bei 2000 xg abzentrifugiert. Der Überstand, der den pBK-CMV-Phagemid-Vektor als filamentöse Phagenpartikel enthält, wurde in ein neues Gefäß pipettiert. Er kann bei 4 °C 1-2 Monate gelagert werden.

NZY-Medium wurde mit einer Einzelkolonie *E. coli* XL0LR angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert, dann abzentrifugiert und mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 resuspendiert. 10 µl und 100 µl des Phagenüberstandes wurden mit jeweils 200 µl *E. coli* XL0LR-Zellen (in 10 mM MgSO<sub>4</sub>) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl NZY-Medium wurde noch einmal 45 min inkubiert, danach auf LB Kan<sup>25</sup>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von den auf den Platten gewachsenen Kolonien wurden 4 ml LB Kan<sup>25</sup>-Kulturen angesetzt und Plasmide isoliert. Durch Restriktionsendonuklease-Spaltung und Agarosegelelektrophorese wurden die Plasmide kontrolliert. Plasmide mit entsprechenden Inserts wurden sequenziert, um die DNA-Sequenz des gesuchten Asparaginasegens zu erhalten.

### 3.28 Genome Walker PCR

Mit der Methode der „Genome Walker PCR“ kann man von einem bekannten Teil einer DNA-Sequenz in unbekannte Bereiche vordringen und so die DNA-Sequenz ermitteln [Siebert *et al.*, 1995]. Bei dieser Methode wird zunächst genomische DNA des Organismus aus dem die Sequenz aufgeklärt werden soll, isoliert. Die DNA wird in 5 Aliquots mit einem der folgenden Restriktionsenzyme geschnitten: *PvuII*, *DraI*, *EcoRV*, *ScaI*, *SspI*. (Jedes dieser fünf Enzyme erzeugt glatte (blunt) DNA-Enden.) Dadurch

erhält man 5 DNA-Bibliotheken. Die DNA-Fragmente werden mit zwei Adaptern, von denen einer am 3'-Ende mit einer NH<sub>2</sub>-Gruppe blockiert ist, ligiert. Dann wird mit einem Adapterprimer und einem genspezifischen Primer eine PCR durchgeführt. Die dabei entstandenen Fragmente werden mit einer zweiten PCR, bei der außer dem Adapterprimer ein weiterer „nested“ genspezifischer Primer eingesetzt wird, noch einmal amplifiziert. (s. Abb. 3.1)

Zur Herstellung der 5 Genbibliotheken von genomischer DNA aus *P. fluorescens* wurden jeweils 1,8 ng DNA mit 4 µl (10 Units/µl) *PvuII*, *DraI*, *SspI*, *ScaI* und *EcoRV* geschnitten (2 h bei 37 °C). Durch Gelextraktion wurden möglichst große Fragmente der einzelnen Restriktionen isoliert und mit folgenden Adaptern ligiert:

ADA 1:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3'

ADA 2: 5'-ACCTGCCC-NH<sub>2</sub>-3'

Zur Ligation wurden 12 µl geschnittene DNA mit 3,2 µl (160 pmol) ADA 1 und 1,6 µl (160 pmol) ADA 2 und 1 U T4-DNA-Ligase ligiert. Mit dem Adapterprimer (ADP) und einem genspezifischen Primer (PR 2) wurde dann eine PCR durchgeführt.

ADP: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Dazu wurden 30 µl Template-DNA mit jeweils 64 pmol ADP und PR 2, 10 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl dNTPs (10 mM, Appligene), 5 µl DMSO versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5 U *Taq*-Polymerase (peqlab), wurde die Lösung mit Mineralöl überschichtet und in den Thermocycler gestellt. Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:

Zyklen	T / °C	t / min	T / °C	t / min	T / °C	t / min
1	94	2				
5	94	0,5	55	1	72	1
5	94	0,5	60	1	72	1
30	94	0,5	65	1	72	1
1	4					

Anstelle einer zweiten PCR wurden die erhaltenen PCR-Fragmente nach Aufreinigung sequenziert.

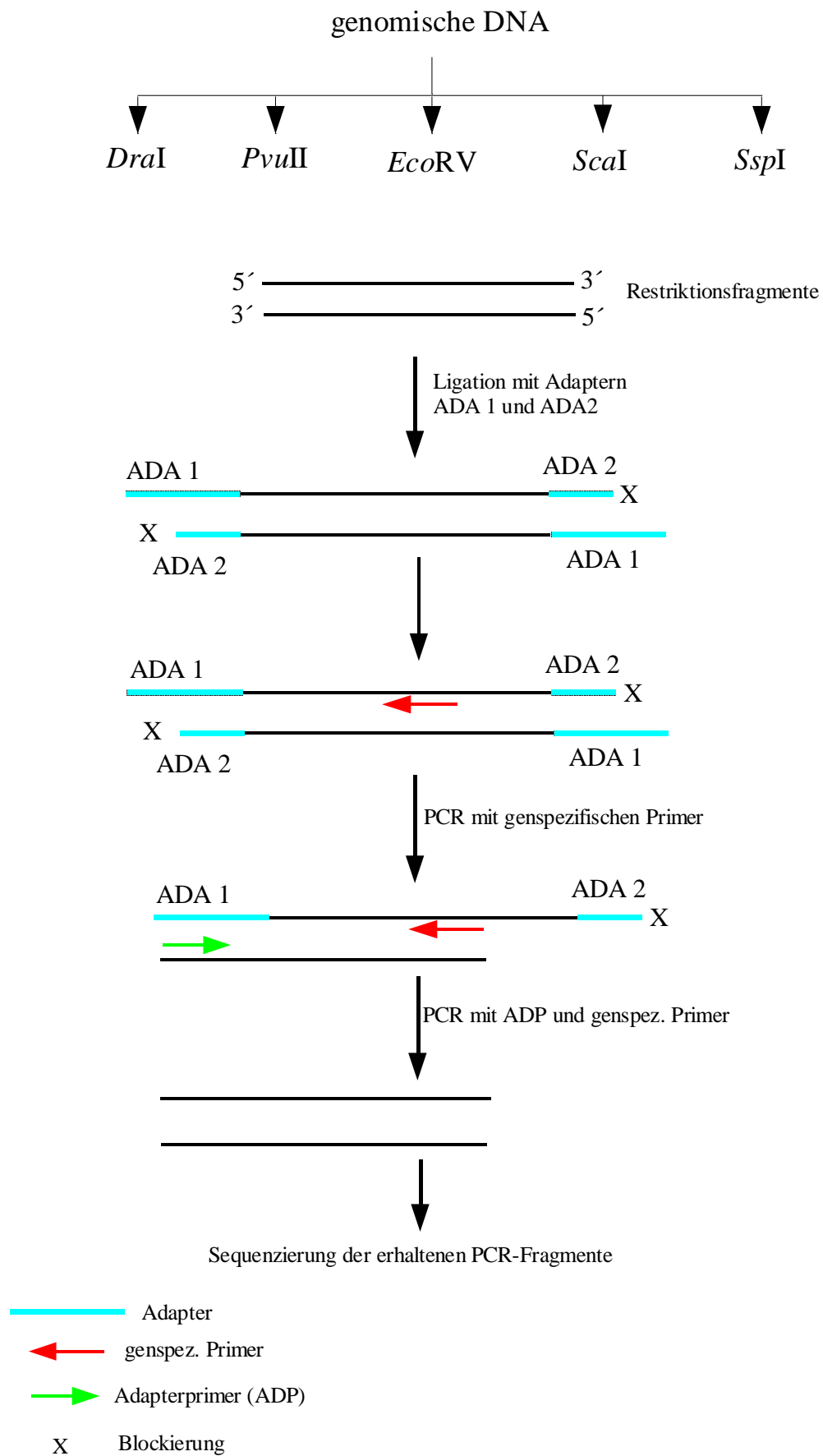


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der „Genome Walker PCR“

### 3.29 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gram- negativen Bakterien wurden zwei Methoden verwendet.

#### 3.29.1 RNA-Isolierung mit Guanidinisothiocyanat und Phenol

Für die Präparation größerer Mengen RNA aus Bakterien wurde eine etwas abgewandelte Methode von Chirgwin und Chomczynski verwendet [Chirgwin, J. M. *et al*, 1979; Chomczynski *et al*, 1987]. Grundlage dieses Verfahrens sind die Eigenschaften von Guanidinisothiocyanat, das Zellen lysieren und zugleich RNasen inaktivieren. Durch eine anschließende organische Extraktion werden Proteine von der RNA abgetrennt [Sabourin *et al*. 1996] Für die Isolation wurde peqGold RNAPure-Lösung (peqlab) verwendet. Diese Lösung enthält eine Mischung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol.

Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet mit jeweils 1 ml /  $10 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Während einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen lysiert und RNasen inaktiviert. Nach Zugabe von 0,2 ml  $\text{CHCl}_3$  /  $10 \times 10^6$  Zellen und kräftigem Mischen wurde 10 min bei RT inkubiert. Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 12000 rpm erfolgte die Trennung der organischen und wässrigen Phase. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 1 ml /  $10 \times 10^6$  Zellen Isopropanol versetzt. Nachdem 15 min bei RT inkubiert worden war, wurde die ausgefällte RNA 10 min bei 12000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und dann in RNase freiem  $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst.

#### 3.29.2 RNA-Isolierung mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ von BM

Bei dieser Methode werden die Bakterienzellen zunächst mit Lysozym in einem Lysepuffer lysiert. Dabei werden gleichzeitig alle RNasen inaktiviert. Danach werden in Gegenwart eines chaotropen Salzes Nukleinsäuren spezifisch an eine Glasfaser-oberfläche gebunden [Vogelstein & Gillespie, 1979]. Dabei sind die Bindebedingungen

für RNA optimiert. Durch eine DNaseI-Reaktion direkt auf der Glasfasersäule, werden Reste noch vorhandener DNA abgebaut. Nach einigen Waschschritten wird die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

1,5 ml einer *P. fluorescens* Übernachtskultur wurden bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl 10 mM Tris pH 8,0 resuspendiert. Anschließend wurden 4 µl Lysozym (50 mg/ml) zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Lyse-Puffer und Mischen wurde das Lysat auf eine Glasfaser-Filtersäule (High Pure Filter Tube, Boehringer Mannheim) pipettiert und 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, 100 µl DNaseI-Lösung auf die Säule gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer I, 500 µl Waschpuffer II und mit 200 µl Waschpuffer II gewaschen. Durch eine anschließende zweiminütige Zentrifugation bei 12000 rpm wurden noch vorhandene Waschpufferreste entfernt. Die RNA wurde mit 50 - 100 µl mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

#### Lyse-Puffer

Guanidiniumchlorid	4,5	M
Tris/HCl	50	mM
Triton X-100	30	% (w/v)
		pH 6,6

#### DNase-Inkubationspuffer

NaCl	1	M
Tris/HCl	20	mM
MnCl <sub>2</sub>	10	mM
		pH 7,0

#### DNaseI-Lösung

DNase	10	µl
DNase-Inkubationspuffer	90	µl

#### Waschpuffer I

Guanidiniumchlorid	5	M
Tris/HCl	20	mM
(in 37,5 % Ethanol)		pH 6,6

**Waschpuffer II**

NaCl	20	mM
Tris/HCl (in 37,5 % Ethanol)	2	mM
		pH 7,5

**3.30 5'- RACE**

(„Rapid Amplification of cDNA Ends“)

Um den Promotor eines Gens zu finden, wird normalerweise ein „Primer Extension“-Experiment durchgeführt. Bei dieser Methode wird an die mRNA bzw. RNA ein genspezifischer Primer angelagert, der am 5'-Ende markiert ist. Mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase wird dann der Primer zur cDNA verlängert („Primer Extension“). Dabei kann die cDNA nur so lang werden, bis das Ende der mRNA (also der Transkriptionsstart) erreicht ist. Die so erhaltenen cDNA wird auf einem Sequenzgel parallel zu einer Sequenzierung des Genabschnittes aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Detektion mit einem Röntgenfilm, erscheint das Signal der Markierung des Primers auf der Höhe der Base, bei der die Transkription beginnt. Die 5'-RACE-Methode ist praktisch eine um eine PCR erweiterte „Primer Extension“ [Frohman et al., 1988].

Bei der 5'-RACE wird zunächst mRNA präpariert. Mit einem genspezifischen Primer 1 (GSP 1) wird der erste Strang der cDNA mit einer Reversen-Transkriptase synthetisiert. Durch RNase-Verdau (RNase-Mix aus RNase H und RNase T1) wird dann die RNA abgebaut. Mit einer terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) wird an das 3'-Ende des cDNA-Erststranges eine Oligo (dC)-Ankersequenz angehängt. Mit dem Ankerprimer (AAP) für diese Sequenz und einem genspezifischen Primer 2 (GSP 2) wird über PCR der zweite Strang der cDNA hergestellt und die cDNA amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt kann mit einem weiteren genspezifischen Primer mit Hilfe der PCR angereichert werden. Außerdem können die amplifizierten Fragmente über die durch die Primer eingeführten Restriktions-Schnittstellen kloniert werden. Nach der Klonierung können die erhaltenen Fragmente sequenziert werden und so der Transkriptionsstart identifiziert werden. Ein Schema der RACE-Methode ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

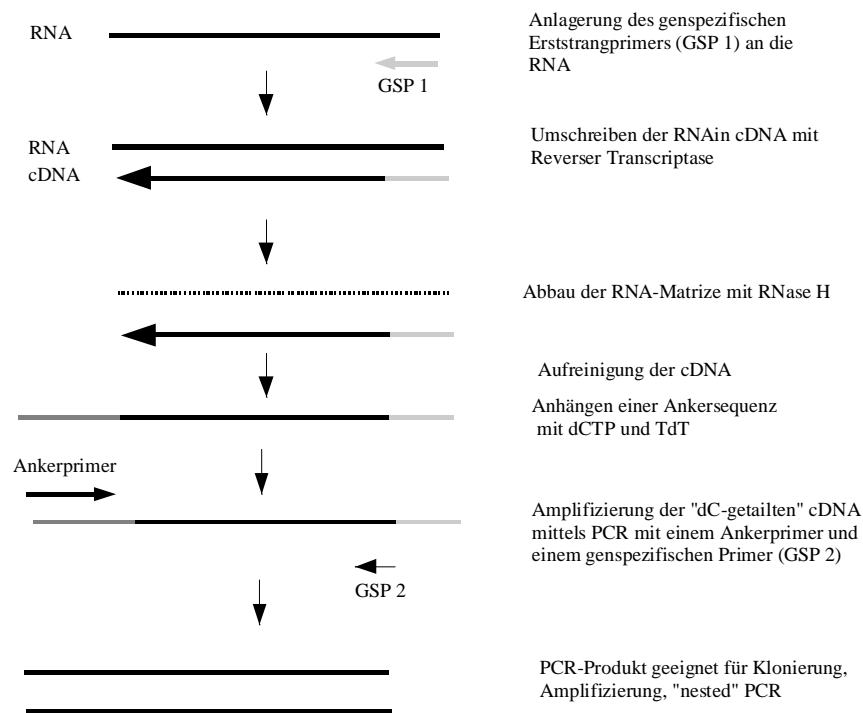


Abb. 3.2: Schema der 5' RACE

Da Pseudomonaden Prokaryoten sind und eine spezifische Isolierung von mRNA nicht möglich ist, wird von der Gesamt-RNA ausgehend mit der cDNA-Synthese begonnen. Dazu wird zunächst aus 25 ml *P. fluorescens* Übernachtskultur mit Guanidin-isothiocyanat und Phenol (RNApure; peqlab) und PLGAII Zentrifugenröhrchen (peqlab) Gesamt-RNA isoliert. Nach spektroskopischer Mengen- und Reinheitsbestimmung wurden ca. 500 ng RNA mit 2,5 pmol genspezifischer Primer (PR 2) versetzt, und mit dH<sub>2</sub>O auf 15,5 µl aufgefüllt. Durch 10 minütige Inkubation bei 70 °C wurde die RNA denaturiert. Nachdem die RNA auf Eis gestellt worden war, wurde sie mit 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2,5 µl DTT (0,1 M) versetzt, so daß ein Gesamtvolumen von 24 µl erhalten wurde. Nach vorsichtigem Mischen wurde 1 min bei 42 °C vorinkubiert, dann 1 µl SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) zugefügt und 50 min bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde 15 min auf 70 °C erhitzt und danach kurz zentrifugiert. Nachdem die Reaktionsmischung eine Temperatur von 37 °C erreicht hatte, wurde 1 µl RNase Mix (Life Technologies) zugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Mischung auf Eis gestellt und der Erststrang der cDNA mit



„Glass Max DNA Spin Säulen“ (Life Technologies) aufgereinigt. Um die Oligo-dC-Ankersequenz an den cDNA-Strang zu hängen, wurden 10 µl der isolierten cDNA mit 6,5 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O und 2,5 µl 2 mM dCTP versetzt. Nach 2-3 min Inkubation bei 94 °C wurde die Mischung kurz zentrifugiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 µl TdT (Life Technologies) wurde 10 min bei 37 °C inkubiert und danach die TdT 10 min bei 65 °C inaktiviert. Nach Zentrifugation wurde die Reaktionsmischung auf Eis gestellt. Für die PCR der dC-tailed cDNA werden 31,5 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl GSP2, 2 µl AAP und 5 µl der dC-tailed cDNA zusammengemischt und mit 0,5 µl (5 U/µl) versetzt. Nach Überschichten mit Mineralöl erfolgte die Amplifizierung bei folgenden Temperaturen:

(Der Thermocycler wurde auf 94 °C vorgeheizt)

Cyclen	T / °C	t / min	T / °C	t / min	T / °C	t / min
1	94	2				
5	94	0,5	53	1	72	1
30	94	0,5	55	1	72	1
1	72	5				
1	4					

GSP 2: 5'- TAC TCG GCG ACC CAA CTG CAG AAG GT -3'

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft.

Ein Teil der erhaltenen Fragmente wurde direkt zur Klonierung in pBluescript SK(+) eingesetzt, mit einem weiteren Teil wurde eine zweite PCR mit einem „nested“ Primer durchgeführt. Mit einigen Fragmenten wurde die Amplifizierung nochmals mit den gleichen Primern wiederholt.

AAP: 5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACG GGI IGG GII GGG IIG -3'

AUAP: 5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'

### 3.31 RNA-Markierung mit Digoxigenin

Zur Markierung von RNA wurde das „DIG Northern Starter Kit“ der Firma Roche verwendet. Bei diesem Verfahren wird eine Template-DNA von einer RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Die in dem Transkriptionspuffer vorhandenen DIG-dUTPs werden in die entstehende RNA eingebaut [Feinberg & Vogelstein, 1983].

Zur Herstellung der RNA-Sonde wurde das in pBluescript II SK(+) klonierte *ansB*-Gen als Matrize verwendet. Da bei der *in vitro* Transkription bessere Ausbeuten mit linearisierter Template-DNA erzielt werden, wurde das *ansB*-Gen mit *PvuII* aus dem Vektor herausgeschnitten. Die beiden *PvuII*-Schnittstellen liegen vor dem T3- bzw. hinter dem T7-Promotor, so daß auf jeden Fall die beiden Promotorsequenzen vorhanden waren. Nach der Restriktion wurde das linearisierte *ansB*-Fragment durch eine Gelextraktion isoliert. Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden wurde die Matrizen-DNA mit Phenol/CHCl<sub>3</sub> extrahiert und mit Ethanol gefällt. 1 µg der auf diese Weise aufgereinigten Matrizen-DNA wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert, mit 4 µl 5x Transkriptionspuffer und 2 µl T7-RNA-Polymerase versetzt. Mit sterilem DMPC-behandeltem Wasser wurde auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 1 h bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 2 µl RNase-freie DNase zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0 abgestoppt und die mRNA-Sonde bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

### 3.32 Northernblot-Analyse

Für die Northernblot-Analyse wurde zunächst RNA auf einem denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit einer spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Durch Chemilumineszenz-Detektion (mit CDP-Star, BM) konnten hybridisierende Fragmente sichtbar gemacht werden.

15 µl Gesamt-RNA wurden mit 20 µl RNA-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Nachdem die Proben 1 min auf Eis gestellt worden waren, wurden jeweils

20 µl auf ein 1 %iges Formaldehydgel aufgetragen und 5 h bei 3 - 4 V/cm (80 V) aufgetrennt. Der Laufpuffer wurde jeweils nach 2 h erneuert. Anschließend wurde die RNA im Kapillarblotverfahren [Sambrook *et al.*, 1989] auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) transferiert. Die Fixierung der RNA auf die Membran erfolgte durch eine 3 minütige Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm).

Die Prähybridisierung erfolgte für 2 h bei 68 °C mit einer gebrauchsfertigen Hybridisierungslösung („DIG Easy Hyb“, Boehringer Mannheim) im Hybridisierungs-Ofen. Zur Hybridisierung wurden 1 µg DIG-markierte RNA 5 min bei 100 °C denaturiert, direkt auf Eis gestellt und danach in 20 ml auf 68 °C vorgewärmte Prähybridisierungslösung („DIG Easy Hyb“, Boehringer Mannheim) pipettiert. Nach Entfernung der Prähybridisierungslösung wurde die Membran über Nacht bei 68 °C mit der Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min mit 2x SSC, 0,1 % SDS bei RT und 2 x 15 min bei 68 °C mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran zunächst kurz in Waschpuffer gelegt und anschließend 30 min in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation mit 10 ml Anti-DIG-Antikörperkonjugat-Lösung wurde 2 x 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Nachdem die Membran 5 min in Detektionspuffer equilibriert worden war, wurde sie mit 1 ml CDP-Starlösung (Boehringer Mannheim) 5 min bei RT inkubiert. Überschüssige CDP-Starlösung wurde entfernt und die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (BIOMAX MR, Kodak) sichtbar gemacht.

#### 10x MOPS

MOPS	200	mM
Natriumacetat	50	mM
EDTA	20	mM
	pH 7,0 (mit NaOH)	

#### RNA-Ladepuffer

Formamid	12,4	M
Formaldehyd	2,2	M
MOPS	1,12	x
Glycerin	7,45	%
Bromphenolblau	0,25	%
DMPC-behandeltes dH <sub>2</sub> O	100	µl

**Agarosegel-Lösung**

Agarose	1,5	g
MOPS	125	ml
37 % Formaldehyd	25	ml

**Gel-Laufpuffer**

MOPS	1	x
------	---	---

**DIG Easy Hyb****20x SSC**

NaCl	3	M
Natriumcitrat	0,3	M
		pH 7,0

**Detektion****Waschpuffer**

Maleinsäure	0,1	M
NaCl	0,15	M
		pH 7,5
Tween 20	0,3 %	(v/v)

**Maleinsäurepuffer**

Maleinsäure	0,1	M
NaCl	0,1	M
		pH 7,5 (mit NaOH (s))

**10x Blockierungslösung**

Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer	10 %	(w/v)
---	------	-------

**1x Blockierungslösung**

1:10 Verdünnung in Maleinsäurepuffer

**Anti-DIG-Antikörperkonjugat-Lösung**

1:10 Verdünnung der Antikörper-Stocklösung in Blockierungslösung

**Detektionspuffer**

Tris/HCl	0,1	M
NaCl	0,1	M
	pH 9,5	

**3.33 Überexpression der *P. fluorescens* Glutaminase-Asparaginase**

Zur Überexpression wurde das *ansB*-Gen in den Expressionsvektor pASK-C [Bader, 1996] kloniert. Dieser Vektor wurde von dem Vektor pASK75 (Biometra, Göttingen) abgeleitet.

Der Vektor pASK-C wurde für die Expression der Dihydro-orotat-Dehydrogenase (DHODH) aus Ratte eingesetzt. Dazu wurde ein DNA Fragment, das die cDNA der DHODH der Ratte und ein DNA-Fragment, das für 8 Histidinreste kodiert, über die *Xba*I- und *Hind*III-Schnittstellen in den Vektor pASK 75 kloniert. Dabei wurden alle Merkmale, die eine Regulation der Expression in pASK 75 ermöglichen [Schmidt *et al.*, 1994], erhalten. Die Expression von Proteinen mit dem pASK 75-Vektor steht unter Kontrolle des tetA-Promotors. Der Operator dieses Promotors wird durch das ebenfalls von pASK 75 kodierte Repressorprotein (TetR) blockiert. Durch Zugabe von nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen an Anhydrotetracyclin (AHT) wird der Promotor induziert. Dadurch wird eine genaue Regulation der Expression möglich.

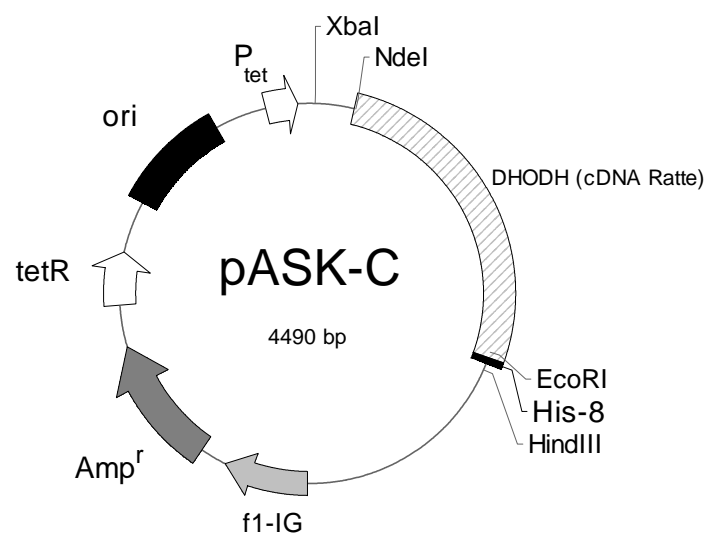


Abb. 3.3: Expressionsvektor pASK-C

Dieser Vektor ermöglicht die Expression eines rekombinanten Plasmids mit C-terminalen His<sub>8</sub>-tag. ori = Replikationsursprung; Amp<sup>r</sup> =  $\beta$ -Lactamasegen, vermittelt Ampicillin-Resistenz; DHODH = Dihydroorotat-Dehydrogenasegen; tetR = Tet-Repressorgen; P<sub>tet</sub> = Tet-Promotor; f1-IG = intergenische Region des Phagen f1

Zur Klonierung wurde zunächst das noch vorhandene Insert (cDNA DHODH, Ratte) durch Restriktion mit *Xba*I und *Eco*RI aus dem Vektor pASK-C entfernt. Der Bereich, der die 8 Histidinreste kodiert, verblieb im Vektor. Nachfolgend wurde das *ansB*-Gen mit *Xba*I und *Eco*RI aus dem Vektor pB-PGA geschnitten und mit dem mit *Xba*I / *Eco*RI geschnittenen pASK-C-Vektor ligiert. Durch diese Klonierung wurde erreicht, daß bei der Expression am C-Terminus der rekombinanten Pf-GA ein His<sub>8</sub>tag angehängt wird, der eine Aufreinigung über Immobilisierte-Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) erlaubt. Für die Expression wurde das erhaltene Plasmid pASK-C/PGA in den Asparaginase-defizienten *E. coli*-Stamm CU1783 (=BL21 $\Omega$ ) [Harms *et al.*, 1991] transformiert. Zur Überexpression wurden zunächst 50 ml LB Amp<sup>100</sup>-Medium mit einer Einzelkolonie BL21 $\Omega$ -pASK-C/PGA angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 ml LB Amp<sup>100</sup>-Medium mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Durch Zugabe von 20  $\mu$ l Anhydrotetracyclin (AHT) (2 mg/ml) wurde die Expression des *ansB*-Gens induziert. Die Expression erfolgte über einen Zeitraum von 5 h. Vor Induktion, sowie 1, 2, 3, 4 und 5 h nach Induktion wurde jeweils 1 ml Kultur für ein SDS-Gel und für Aktivitätstests aus der Kultur entnommen. Die Proben für das SDS-Gel wurden abzentrifugiert, das Pellet in 450  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert, mit 150  $\mu$ l 4x SDS-Puffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Als Kontrolle wurden 200 ml LB Amp<sup>100</sup>-Medium ebenfalls im Verhältnis 1:100 aus der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Diese Kultur wurde jedoch nicht induziert. Nach der fünfstündigen Inkubation wurden jeweils 25 ml abzentrifugiert und die Pellets bei -20 °C für eine Reinigung gelagert.

### 3.34 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe und somit zur Überprüfung der Reinheit von Proteinproben. Durch die Komplexbildung mit SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung und können in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Laufstrecke der denaturierten Proteine in dem Gel hängt von der Mobilität der SDS-Protein-Komplexe in der Acrylamid-Matrix ab und ist proportional zum Logarithmus

der Proteinmasse. Für die Elektrophorese wurde das Laemmli-Gelsystem verwendet, das sich zur Auftrennung von Proteinen mit Massen von 30-200 kDa eignet. Bei diesem Gelsystem werden die Proteine in einem kurzen Sammelgel bei pH 6,8 konzentriert und anschließend in einem längeren Trenngel bei pH 8,8 aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in Minigelkammern durchgeführt, in denen das Trenngel die Maße 8 x 13 cm hat. Die Trenngel- und Sammelgellösung wurden direkt nacheinander in die Gelapparatur gefüllt und ein Kamm in das Sammelgel gesteckt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in eine Elektrophoresekammer gestellt, mit Laufpuffer überschichtet und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proben im Sammelgel erfolgte 15 min bei 80 V und im Trenngel bei 200 V 1-1,5 h. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die blaue Farbstofffront gerade aus dem Gel herausgelaufen war.

### Gelzusammensetzung

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>
Acrylamidkonzentration des Gels	12 %	
Sammelgelpuffer	1250 µl	---
Trenngelpuffer	---	2500 µl
10 % SDS-Lösung	500 µl	1000 µl
Acrylamid	650 µl	4000 µl
Glycerin (87 %)	---	1000 µl
H <sub>2</sub> O (bidest)	2600 µl	1450 µl
TEMED	10 µl	25 µl
APS (10 %)	25 µl	50 µl

### Trenngelpuffer

Tris/HCl

1,5 M

pH 8,8

**Sammelgelpuffer**

Tris/HCl	0,5	M
	pH 6,8	

**Probenpuffer**

Tris/HCl	0,1	M
SDS	2	%
$\beta$ -Mercaptoethanol	3	%
Glycerin	10	%
Bromphenolblau	0,01	% (w/v)

**Laufpuffer**

Tris	25	mM
Glycin	0,19	M
SDS	3,5	mM

APS	10	% (w/v)
-----	----	---------

**3.35 Reinigung der rekombinanten PF-GA-His<sub>8</sub> über IMAC**

Eine schnelle und sehr effiziente Möglichkeit der Proteinreinigung stellt die immobilisierte Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) dar. Diese Methode beruht auf einer sehr festen Komplexbildung eines His-tag-Proteins mit einem Übergangsmetallion, das sehr fest an einen „Harz“ gebunden ist. Durch diese sehr stabile Bindung können die Übergangsmetallionen auch unter extremen Chromatographiebedingungen nicht ausgewaschen werden. Durch die ebenfalls sehr starke Bindung des His<sub>8</sub>-tags mit den Metallionen können unspezifisch gebundene Proteine leicht unter relativ stringenter Bedingungen ausgewaschen werden. Die Elution des His-tag-Proteins erfolgt entweder durch einen pH-Gradienten (in Richtung kleinerer pH-Werte) oder durch einen Imidazol-Gradienten. Durch pH-Absenkung werden die N-Atome der Histidinreste protoniert, so daß die Dissoziation des Proteins von der Säule erfolgt. Bei der Elution mit Imidazol findet eine Verdrängung der His-tag-Proteine durch Imidazol statt, das aufgrund seiner Ähnlichkeit mit den Histidinresten um die Koordinationsstellen konkurriert.



Für kleine Mengen reinen Proteins wurden TALONspin-Säulen (Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Der TALON-IMAC-Harz ist ein sehr beständiger und nicht-Nickel-haltiger IMAC-Harz. TALON enthält einen speziellen Polydentat-Metall-Chelator. Dieser Chelator bindet das elektropositive Metallion über vier Koordinationsstellen in einer elektronegativen Tasche. Dadurch wird ein Auswaschen der Metallionen verhindert. Zwei weitere Koordinationsstellen sind frei zugänglich, so daß sie His-tag-Proteine binden können.

### **Prozedur**

Das bei der Expression erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml Ultraschall-Puffer / 25 ml Kultur resuspendiert und nach Zugabe von 0,75 mg/ml Lysozym 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C abgetrennt. Der klare Überstand wurde auf eine TALONspin-Säule aufgetragen und das His<sub>8</sub>-tag-Protein nach Herstellerangaben mit einem pH-Gradienten gereinigt.

Für größere Mengen Protein bzw., wenn sehr reines Protein benötigt wurde, wurde eine FPLC-Reinigung über Ni-NTA-Agarose (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurde eine Säule (Name Bezeichnung; Pharmacia) mit ca. 2-3 ml Ni-NTA-Agarose gefüllt. Bevor mit der Reinigung begonnen wurde, wurde die Säule mit 2-3 Bettvolumen Puffer A equilibriert. Um die Eluierung des Proteins zu verbessern wurde die Säule nachfolgend mit 100 % Puffer E 1 (= 250 mM Imidazol) gespült und erneut mit Puffer A equilibriert. Um unspezifische Proteinbindungen von vornherein einzuschränken, wurden der Zellrohextrakt nach Ultraschallaufschluß mit 10 mM Imidazol aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit 3-5-Bettvolumen Puffer B gewaschen, bevor die Proteine mit einem linearen Imidazolgradienten von 20 mM - 250 mM bzw. 500 mM eluiert wurden. Dabei wurde das Eluat fraktioniert gesammelt. Die Flußrate beim Auftragen der Zellrohextrakte und beim Waschen betrug 0,75 ml/min. Während des Gradienten betrug die Flußrate 0,5 ml/min. Es wurden jeweils 2 ml-Fraktionen gesammelt. Um zu testen, in welchen Fraktionen sich die Haupt-Asparaginase-Aktivität befand wurde ein Mikrotiterplatten-AHA-Test durchgeführt. Die Fraktionen mit der größten Aktivität wurden durch SDS-PAGE auf ihre Reinheit untersucht.

**Puffer A**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	10	mM
		pH 8

**Puffer B**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	20	mM
		pH 8

**Puffer E1**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	250	mM
		pH 8

**Puffer E2**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	mM
NaCl	300	mM
Imidazol	500	mM
		pH 8

**3.36 Konjugativer Transfer von Plasmiden**

Zum Transfer von Plasmiden in *P. fluorescens* wurde die Methode der natürlichen Konjugation durch „diparentales mating“ angewendet. Bei dieser Methode wird ein mobilisierbares Plasmid (*mob*+) von einem Donorbakterium auf ein Repizientenbakterium übertragen. Als Donorbakterium diente der *E. coli* Stamm S 17-1 [Simon *et al.*, 1983], der genetisch so verändert wurde, daß er die Transfergene des „broad host range“ IncP-Typ Plasmids RP 4 in seinem Chromosom integriert enthielt. Dadurch ist der Stamm in der Lage jedes gramnegative Bakterium als Empfänger für den konjugativen DNA-Transfer zu nutzen. Als Vektorplasmid diente der „suicide“ Vektor pOT182, welcher den „self cloning“ Vektor Tn5::OT182 enthält [Merriman & Lamont, 1993]. Der Vektor ist abgeleitet von pSUP 102(Gm)::Tn5-B21 [Simon *et al.*, 1989] und eignet sich für die „random“ Tn5-Mutagenese. Innerhalb des Tn5-Elements befinden sich Gene, die Resistenz gegen Carbenicillin und Tetracyclin

vermitteln. Das Plasmid pOT182 besitzt nur den ColE1-Replikationsursprung und ist nicht in der Lage sich außerhalb von *E. coli* zu replizieren. Das Plasmid enthält die *mob*-Erkennungsstelle und kann daher von dem Donorstamm mit hoher Frequenz in Rezipientenstämme mobilisiert werden.

Als Rezipient diente der *P. fluorescens* WT Stamm (DSM), der nach erfolgreicher Transkonjugation eine Antibiotika-Resistenz gegen Tetracyclin und Carbenicillin besaß. Dadurch konnten Transkonjuganten auf Agarplatten, die diese beiden Antibiotika enthielten, selektiert werden.

Von *E. coli* S 17-1 (pOT182) und *P. fluorescens* WT wurden Übernachtskulturen in LB, Cm<sup>100</sup> und LB angezogen. Mit diesen Kulturen wurde frisches LB, Cm<sup>100</sup> (*E. coli* S 17-1 pOT182) bzw. LB-Medium (*P. fluorescens*) im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C bzw. 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,5 inkubiert. Wenn die Zellen nicht die gleiche OD<sub>600</sub> besaßen, so wurde sichergestellt, daß die *P. fluorescens*-Zellen eine höhere OD<sub>600</sub> als der Donorstamm hatten. Der *P. fluorescens*-Rezipient und der Donorstamm wurden in den Verhältnissen 1:1; 1:2, 1:5 und 5:2 miteinander vermischt und die Zellen bei 5000 rpm kurz abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 100 µl dH<sub>2</sub>O oder M9<sup>+</sup>Salzlösung resuspendiert. Jeweils 50 µl dieser Zellsuspension wurden auf Cellulose-Acetate-Filter (0,2 µm Porengröße, Sartorius), die auf vorgewärmten LB-Agarplatten ohne Antibiotika lagen, aufgetropft und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit jeweils 1 ml dH<sub>2</sub>O von den Filtern gespült und folgende Verdünnungen in dH<sub>2</sub>O angesetzt: 100 : 100 und 100 : 500. Jeweils 100 µl von den Verdünnungen und 100 µl der unverdünnten Zellsuspension wurden auf Selektionsplatten ausplattiert. Als Selektionsplatten wurden M9<sup>+</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>-M9<sup>-</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>-Glutamat (5 mM) und M9<sup>+</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup> γ-Glutamylhydrazid (2 mM)-Platten verwendet. Nach dem Ausplattieren wurden die Selektionsplatten 2 - 4 Tage bei 30 °C inkubiert, bevor die einzelnen Transkonjuganten auf M9<sup>+</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>-, M9<sup>-</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>-Glutamat (5 mM) und M9<sup>+</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup> γ-Glutamylhydrazid (2 mM) - Master-Platten umgesetzt wurden. Bevor die Mutanten auf defekte Enzyme, die am N-Stoffwechsel beteiligt sind, getestet werden konnten, mußten sie mindestens dreimal auf frische Selektionsplatten umgesetzt werden. Dadurch wurde sichergestellt, daß der *E. coli*-Donor nicht mehr vorhanden war.

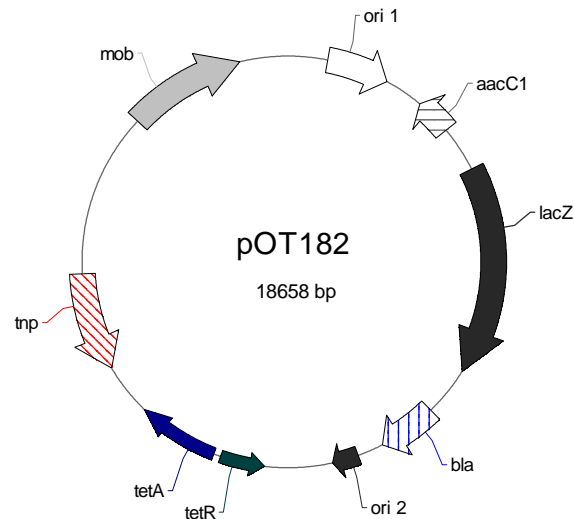


Abb. 3.4. Transposon Carrier Plasmid pOT182

ori 1 = p15A Replikationsursprung; aac1 = Gentamicin-Acetyltransferase I-Gen; lacZ =  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (verkürzt); bla =  $\beta$ -Lactamasegen; ori 2 = pBR325 Replikationsursprung; tetR = tet-Regulatorgen; tetA = Tetracyklin/ $H^+$ -Antiportergen; tnp = Transposase; mob = RP 4-Mobilisierungsregion, enthält Chloramphenicol-Acetyltransferase (cat)-Gen;

### 3.37 Aktivitätstests

#### 3.37.1 Bestimmung der Asparaginase-Aktivität mit L-Asparaginsäure- $\beta$ -Hydroxamat

[Derst *et al.*, 1994]

Zur Bestimmung der Asparaginase-Aktivität wurde L-Asparaginsäure- $\beta$ -Hydroxamat (AHA) als Substratanalogon eingesetzt. Die Asparaginase setzt dieses Substrat zu L-Asparaginsäure und Hydroxylamin um. Das Hydroxylamin reagiert in mäßig alkalischer Lösung mit 8-Hydroxychinolin im Überschuß zu einem grünen Indoxinfarbstoff. Der Vorteil von AHA gegenüber den natürlichen Substraten Asparagin oder Glutamin liegt in dem um den Faktor 10 höherem  $K_m$ -Wert der Reaktion. Dadurch ist der Nachweis des entstehenden Hydroxylamins wesentlich empfindlicher.

Reaktionsgleichung:

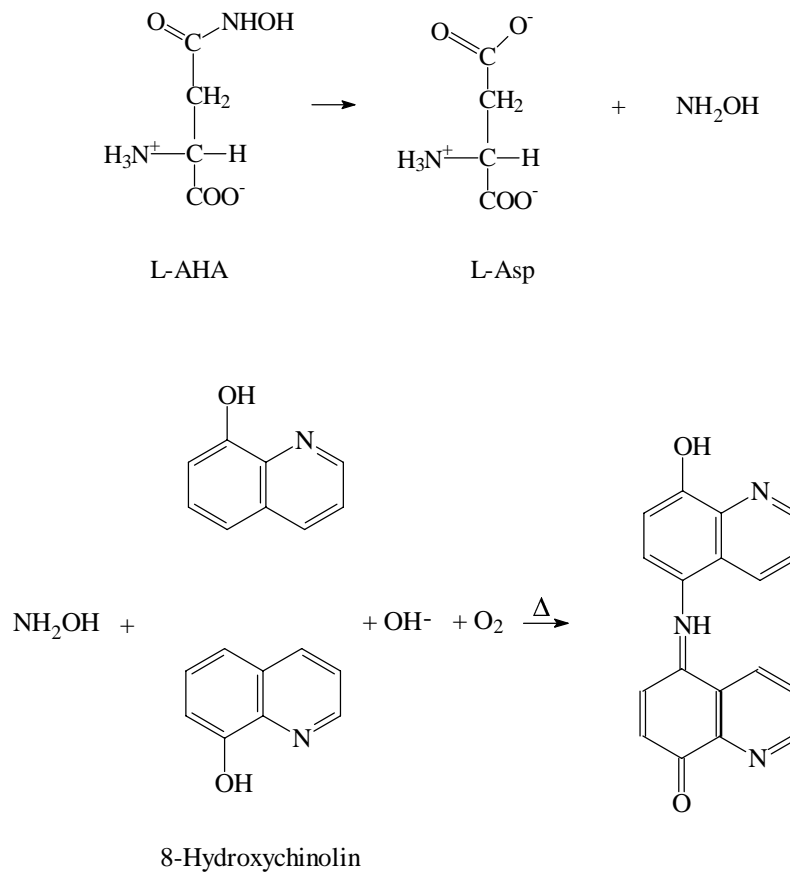


Abb. 3.5: Reaktionsgleichung des AHA-Tests

Der Test wurde mit lebenden Zellen durchgeführt. Da *Pseudomonas* ebenso wie *E. coli* eine periplasmatische und eine cytosolische Asparaginase besitzt, war es wichtig, dass für den Test nur intakte Zellen verwendet wurden. Durch den Test sollte nur die Aktivität der regulierten periplasmatischen Asparaginase gemessen werden. Durch die Lyse von toten Zellen und der damit verbundenen Freisetzung der cytosolischen Asparaginase, wären die Meßwerte verfälscht worden.

100 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl 10 mM AHA versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 µl 12 % TCA zugegeben. Nach Zugabe von 1 ml Oxinlösung, Erhitzen für eine Minute auf 100 °C, Abkühlen auf RT und kurzer Zentrifugation wurde die Extinktion bei 705 nm bestimmt.

### 3.37.2 Mikrotiterplatten-AHA-Test

Für die Aktivitätsbestimmung der Mutanten wurde dieser Test zur Durchführung in Mikrotiterplatten modifiziert. Dazu wurden 100 µl M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium in jedes Well vorgelegt und jeweils mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die Platte wurde auf einem Inkubationsschüttler bei 30 °C inkubiert und die OD<sub>600</sub> alle 60 min bestimmt. Sobald die Bakterien die exponentielle Phase erreicht hatten, wurden 10 µl 10 mM AHA zugegeben und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Oxinlösung wurde die Platte 10-15 min bei RT stengelassen und anschließend die Extinktion bei 655 nm im ELISA-Reader gemessen.

Bei beiden Testverfahren wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt.

Für die Negativkontrolle wurde *P. fluorescens* WT in M9<sup>+</sup>-Medium angezogen, da die periplasmatische Asparaginase durch Glucose reprimiert wird [Klöppner, 1999]. Da die Asparaginase durch Glutamat induziert wird [Klöppner, 1999], wurde als Positivkontrolle *P. fluorescens* WT in M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium angezogen. Als Leerwert dient reine Oxinlösung.

#### AHA-Lösung

L-Asparaginsäure-β-Hydroxamat  
in 50 mM MOPS                      10        mM  
pH 7,0

#### MOPS

MOPS in dH<sub>2</sub>O                      50        mM  
pH 7,0

#### Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O                      1        M

**Oxin-Lösung**

2 % Hydroxychinolin		
in Ethanol	25	%
1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	75	%

**TCA-Lösung**

TCA in dH <sub>2</sub> O	12	%
--------------------------	----	---

**M9<sup>+</sup>Medium**

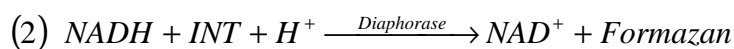
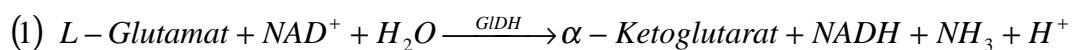
= M9-Minimalmedium

**M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium**

M9-Medium ohne Ammoniumchlorid und ohne Glucose, aber mit 5 mM Glutamat

**3.37.3 Glutamatbestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase, Diaphorase und Tetrazoliumsalzen**

Diese Glutamatbestimmung beruht auf der Umsetzung von L-Glutamat durch die Glutamat Dehydrogenase (GIDH) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat in Anwesenheit von NAD.[Beutler, H.O. & Michal,G., 1974] Das entstehende NADH setzt dann in Gegenwart des Enzyms Diaphorase INT zu einem rotem Formazan um, dessen Extinktion im sichtbaren Bereich bei 490 nm gemessen wird. Die Reaktionsgleichungen für diese Umsetzung lauten:



Durch die Rückoxidation (2) des in der ersten Reaktion gebildeten NADH, wird die ungünstige Gleichgewichtslage der Reaktion (1) nach rechts verschoben. Dabei wird die

GIDH im Überschuß eingesetzt, um einen vollständigen Umsatz des Glutamats zu gewährleisten.

Um den Test für eine sehr große Anzahl von *Pseudomonas*-Mutanten (Bakterienkulturen) praktikabel zu machen, wurde die ursprüngliche Versuchsvorschrift von Beutler & Michal [Beutler & Michal, 1975] so modifiziert, daß der Test in 96-Well-Plates (Mikrotiterplatten) durchgeführt werden konnte.

Für die Bestimmung der Glutamatabbaufähigkeit wurden die Bakterien in M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium angezogen. Dabei betrug die Glutamat-Konzentration im Medium 0,8 mM. Damit die Bakterien besser anwuchsen, wurde dem Medium 1 mM Glucose zugesetzt.

300 µl M9<sup>-</sup>-Glucose-Medium wurden pro Well in einer Mikrotiterplatte vorgelegt, jedes Well mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde durch eine OD<sub>600</sub>-Messung direkt nach dem Animpfen und nach der Übernachtinkubation kontrolliert. Von diesen Übernachtkultur-Platten wurden 50 µl aus jedem Well in eine neue Mikrotiterplatte überführt. In dieser Platte wurden vorher folgende Lösungen in jedes Well vorgelegt:

20 µl	β-NAD <sup>+</sup>
20 µl	INT
200 µl	Triethanolamin-Phosphat-Puffer

Nach Zugabe von 5 µl Diaphorase wird die Extinktion bei 490 nm im ELISA-Reader (Biorad) bestimmt. Durch diese Messung wird der Nullwert der Reaktion bestimmt, da das INT lichtempfindlich ist und schon nach kurzer Zeit eine rote Farbe aufweist. Nach dieser Messung wurden in jedes Well 5 µl GIDH zugegeben und die Platte 15 min im Dunkeln bei RT stengelassen. Danach wird in 3 Minuten-Abständen die Extinktion bei 490 nm im ELISA-Reader bestimmt. Je stärker die Rotfärbung war, desto weniger Glutamat wurde umgesetzt.

#### **Triethanolamin-Phosphat-Puffer**

Triethanolamin	0,08 M
Kaliumphosphat	0,02 M
	pH 8,6



(a) 1,86 g Triethanolaminhydrochlorid in dH<sub>2</sub>O lösen mit ca. 4,4 ml 2 M KOH auf pH 8,6 einstellen, 0,63 ml Triton X-100 zugeben und mit dH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen.

(b) 0,86 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 7 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 100 ml dH<sub>2</sub>O lösen

20 ml (a) + 5 ml (b)

#### **β-NAD-Lösung**

β-NAD in dH<sub>2</sub>O 6,7 mM

(bei 4 °C 2 Wochen haltbar)

#### **Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT) Lösung**

INT in dH<sub>2</sub>O 1,19 mM

(bei 4 °C im Dunkeln 3 Monate haltbar)

#### **Diaphorase**

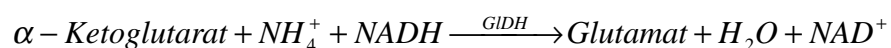
Diaphorase in dH<sub>2</sub>O 1 mg/ml

#### **Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)**

GLDH in 50 % Glycerin 5 mg/ml

### **3.37.4 Gekoppelter optischer Test**

Mit dieser Methode läßt sich direkt der Umsatz an natürlichem Substrat Asparagin über die Detektion der entstehenden Ammoniumionen ermitteln. In Gegenwart eines hohen Überschusses des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase kann man die Abnahme von NADH bei 340 nm, gemäß folgender Reaktion, verfolgen:



Der Extinktionskoeffizient beträgt  $6220 \text{ l cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

Mit diesem Test kann außerdem die Umsatzrate weiterer Substrate des Enzyms ermittelt werden.

Der Nachweis wurde in Mikrotiterplatten bei einem Gesamtvolumen von  $300 \mu\text{l}$  durchgeführt. zu  $268 \mu\text{l}$  Puffer-Substratlösung wurden  $10 \mu\text{l}$   $\alpha$ -Ketoglutarat,  $10 \mu\text{l}$  NADH/ADP-Lösung und  $2 \mu\text{l}$  Glutamat-Dehydrogenase gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $10 \mu\text{l}$  Asparaginase gestartet und die Abnahme an NADH mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes und des Computerprogramms „PC-Kinetik-Collector“ (Biorad) direkt am PC verfolgt.

#### **Puffer**

Natriumacetat	100	mM
MOPS	100	mM
	pH 5,0	

#### **$\alpha$ -Ketoglutarat-Lösung**

$\alpha$ -Ketoglutarat in $\text{H}_2\text{O}$	240	mM
	pH 7,0	

#### **NADH/ADP-Lösung**

NADH	10	mM
ADP	50	mM
in $\text{H}_2\text{O}$ frisch angesetzt		

#### **Glutamat-Dehydrogenase**

GLDH in 50 % Glycerin	1,3	U/ $\mu\text{l}$
-----------------------	-----	------------------

#### **Substrate**

L-Asparagin-Stammlösung	20	mM
D-Asparagin-Stamlösung	20	mM
L-Glutamin-Stammlösung	20	mM

### 3.38 Mikrotiter-Glycerinstock-Platten

Um das Wachstum von *Pseudomonas*-Mutanten auf verschiedenen Medien zu untersuchen, wurden Bakterien in 96-Well-Plates (steril, Greiner) in M9<sup>-</sup>-Medium mit Glutamat (5 mM) oder Asparagin (5-10 mM) angezogen. Dazu wurden 270 µl M9<sup>-</sup>-Medium in jedes Well pipettiert und mit einer Bakterienkolonie inokuliert. Nach Wachstum bei 30 °C über Nacht wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt, pro Well 80 µl 87%iges Glycerin zugegeben und die Platte bei -86 °C eingefroren.

### 3.39 Umstempeln von Bakterienkolonien

Zur Überprüfung der Fähigkeit der *Pseudomonas*-Mutanten auf verschiedenen AS zu wachsen, wurden die Bakterien mit einem speziell für 96-Well-Plates konstruierten Replica-Plater von den Glycerinstock-Platten auf die gewünschte M9<sup>+</sup> Platte gestempelt. Der Replica-Plater besteht aus Edelstahlschrauben, die in einer Metallplatte befestigt sind. Dabei entsprechen die Anzahl und die Abstände der Schrauben denen einer 96-Well-Platte. Mit diesem Stempel kann das Koloniemuster der Glycerinstock-Platten als Positivabdruck auf entsprechende Agarplatten übertragen werden.

Dazu wurde der Replica-Plater, nachdem er in der Flamme sterilisiert worden war, in eine Glycerinstock-Platte getaucht. Dabei darf die Platte nicht vollständig auftauen. Nachdem an jedem „Zacken“ des Stempels etwas von dem entsprechenden Glycerinstock haften geblieben war, wurde der Stempel auf eine M9<sup>-</sup>-Agarplatte, die die entsprechende Aminosäure enthielt, gesetzt. Diese Platten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert und Kolonien, die nicht angewachsen waren am nächsten Tag identifiziert.

### 3.40 Selektion auf $\gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten

Zur Selektion von Bakterien, die kein Glutamat abbauen oder in die Zelle transportieren können, wurden  $\gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten eingesetzt. Dazu wurden die Bakterien auf M9<sup>+</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>  $\gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten ausplattiert. Da das  $\gamma$ -Glutamylhydrazid ein

toxisches Substratanalogon des Glutamats (Aspartats) ist, können nur Zellen auf diesen Platten überleben, welche einen Defekt entweder im Glutamat-Transportsystem oder in einem Glutamat-abbauenden Enzym haben. Sobald die Zellen das  $\gamma$ -Glutamylhydrazid aufnehmen und abbauen können, wird Hydrazin bzw. ein Hydrazinium-Ion freigesetzt (s. Abb. 3.6), welches extrem toxisch ist, und zum Tod der Zelle führt.

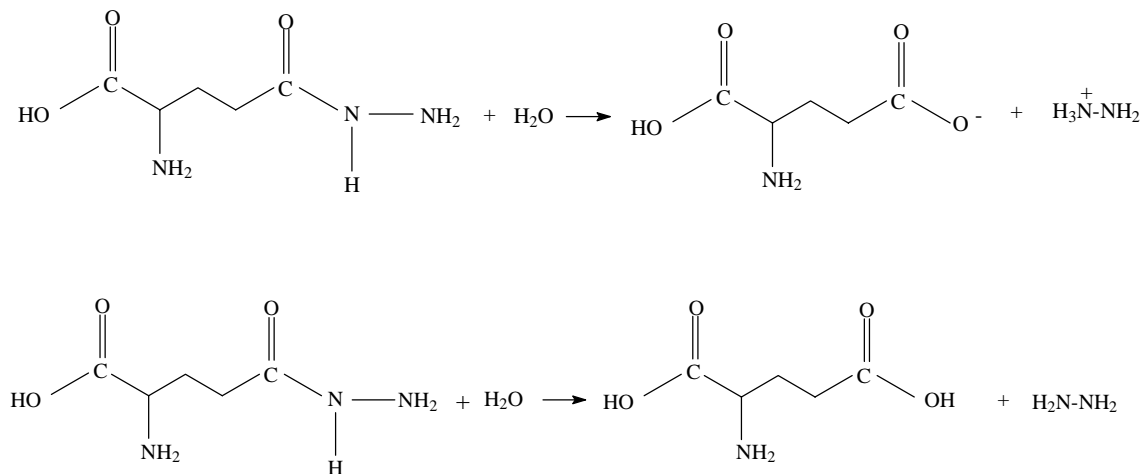


Abb. 3.6: Zersetzung von  $\gamma$ -Glutamylhydrazid

## 4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Aminosäure-Verwertung sollten Enzyme identifiziert und kloniert werden, die am Abbau und Transport der Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat beteiligt sind. Zu den wenigen bekannten Enzymen, die an der Verwertung der genannten Aminosäuren beteiligt sind, gehören die Glutaminasen-Asparaginasen. Da von einigen Asparaginasen die Gene bereits kloniert wurden, bot es sich an, zunächst nach einer Glutaminase-Asparaginase in *P. fluorescens* zu suchen, sie zu klonieren und zu sequenzieren. Anschließend wurde mit Hilfe der Transposon-Mutagenese versucht, weitere Enzyme, die am Abbau und Transport von Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat beteiligt sind, zu identifizieren.

### 4.1 Herstellung einer $\lambda$ ZAP-Express Genbank von *P. fluorescens*

Zur Herstellung einer  $\lambda$ ZAP-Express Genbank wurde zunächst aus 25 ml einer *P. fluorescens* Übernachtskultur mit einer Genomic-tip 500/G-Säule genomische DNA isoliert. Die DNA wurde mit *Sau3AI* statistisch geschnitten. Die Restriktionsansätze, die hauptsächlich DNA-Fragmente im Größenbereich von 9-12 kb enthielten, wurden einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Nach Tropfendialyse gegen TE-Puffer, DNA-Fällung und analytischem Agarosegel, wurden die Fraktionen mit DNA-Fragmenten im Bereich von 9-12 kb bestimmt. Diese wurden mit dem *Bam*HI-geschnittenen  $\lambda$ ZAP-Armen ligiert und in Phagenhüllen verpackt. Die hergestellte Genbank hatte einen Titer von  $2,2 \times 10^8$  pfu/ml.

### 4.2 Herstellung einer DIG-markierten Asparaginase-Sonde

Durch PCR mit degenerierten Asparaginaseprimern (AsnFor und AsnBack), die aufgrund von Sequenzhomologien bekannter Asparaginasegene synthetisiert wurden, wurde mit *P. fluorescens* DNA als Template ein 266 bp großes DNA-Fragment erhalten. Grundlage für die Primer waren zwei hochkonservierte Bereiche zwischen den Aminosäuren T-9 und A-14 sowie zwischen H-87 und M-92 (*E. coli*-Numerierung). Es

wurden degenerierte Primer erstellt, um die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung an entsprechende homologe Sequenzen der *Pseudomonas* DNA zu erhöhen. Das erhaltene Fragment wurde über die durch die Primer eingeführten Schnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor pBluescript SK(+) kloniert und in kompetente *E. coli* XL1Blue Zellen transformiert. Es wurde ein positiver Klon erhalten, aus dem das Plasmid 1/22 isoliert und sequenziert wurde. Ein Vergleich (BLASTN, BLASTP) der Sequenz von 1/22 mit in Datenbanken vorhandenen Sequenzen zeigte Homologien zu dem *ansB*-Gen aus *E. coli*, zu dem von der Proteinsequenz abgeleiteten *Glutaminase-Asparaginase*gen aus *Pseudomonas sp.7A* sowie zu einigen anderen bekannten Asparaginasen aus verschiedenen Organismen. Die gefundenen Übereinstimmungen sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 zusammengefaßt.

Tabelle 4.1: Übereinstimmungen der Sonde mit konservierten Asparaginase-Bereichen

Organismus	Aminosäuresequenz um T-9 bis A-14*			
<i>E. coli</i>	<b>LPNITILA</b>	<b>TGGTIA</b>	<b>GGGD</b>	
<i>P. fluorescens</i>	<b>LANVVILA</b>	<b>TGGTIA</b>	<b>GAGA</b>	
<i>P. sp 7A</i>	<b>LANVVILA</b>	<b>TGGTIA</b>	<b>GAGA</b>	
Aminosäuresequenz um H-87 bis M-92*				
<i>E. coli</i>	<b>DGFVIT</b>	<b>HGTDTM</b>	<b>EETAY</b>	
<i>P. fluorescens</i>	<b>DGIVIT</b>	<b>HGTDTL</b>		
<i>P. sp. 7A</i>	<b>DGIVIT</b>	<b>HGTDTL</b>	<b>EETAY</b>	

\*) Numerierung bezieht sich auf die *E. coli* Sequenz

*P. sp. 7A* = *Pseudomonas sp. 7A*

Dabei muß berücksichtigt werden, daß die DNA-Sequenz der *Pseudomonas sp. 7A* Glutaminase-Asparaginase (PGA) von der Aminosäuresequenz abgeleitet wurde. Da die PGA nur als Protein isoliert und gereinigt worden ist, wurde eine Proteinsequenzierung durchgeführt. Die abgeleitete DNA-Sequenz ist daher nicht zu 100 % korrekt. Dennoch beweist die sehr große Ähnlichkeit auf Proteinebene, daß die klonierte Sonde eine Teilsequenz der gesuchten Asparaginase aus *P. fluorescens* enthält. Dies wurde durch weitere Übereinstimmungen auf Proteinebene mit Asparaginasen aus *E. chrysanthemi*, *B. subtilis*, *A. glutaminasificans* und *S. cerevisiae* bestätigt.

Tabelle 4.2: Übereinstimmungen der Sonde mit Asparaginasen auf DNA- und Proteinebene

Übereinstimmungen mit der Asparaginase-Sonde auf Proteinebene		
	Ähnlichkeit*	Identität*
AnsB ( <i>E. coli</i> )	77 %	51 %
PGA ( <i>Pseudomonas sp.7A</i> )	95 %	87 %
Übereinstimmungen mit der Asparaginase-Sonde auf DNA-Ebene		
<i>ansB</i> ( <i>E. coli</i> )	63 %	66 %
<i>ansB</i> ( <i>Pseudomonas sp.7A</i> )	76 %	75 %

\*) Die Angaben beziehen sich auf die gesamte Sequenz der Sonde.

Aufgrund der erhaltenen Sequenz wurden die für *P. fluorescens* spezifischen Primer PR 1 und PR 2 erstellt. Mit diesen Primern wurde aus dem Plasmid 1/22 über PCR eine spezifische DIG-markierte Asparaginase-Sonde mit einer Länge von 211 bp hergestellt.

### 4.3 Klonierung des Asparaginasegens aus *P. fluorescens*

Nachdem die Ausbeute der DIG-Markierung abgeschätzt und die Sondenkonzentration optimiert worden war, wurde die  $\lambda$ ZAP-Express Genbank mit der Sonde durchsucht. Dazu wurden auf 20 große ( $\varnothing$  150 mm) NZY Topagar Platten 5000 pfu/ml der Genbank ausplattiert und nach Inkubation Membranabdrücke genommen. Die Membranabdrücke der Plaques wurden mit der Sonde hybridisiert und detektiert. Obwohl der Hintergrund relativ hoch war, wurden einige Plaques ausgestochen, auf kleine ( $\varnothing$  90 mm) NZY Topagarplatten ausplattiert und erneut mit der Sonde hybridisiert. Dabei wurden von jeder Platte zwei Membranabdrücke genommen, um sicherzugehen, daß nicht durch unspezifische Reaktionen der Sonde mit der Membran nicht-positive Plaques erhalten wurden. Die erhaltenen positiven Plaques wurden bis zur Homogenität vereinzelt, so daß nur noch positive Plaques auf einer Platte verblieben. Die positiven Plaques wurden aus den Platten ausgestochen und die Inserts aus den Phagen durch eine „*in vivo excision*“ direkt in das pBK-CMV-Plasmid überführt. Von den erhaltenen Plasmiden wurden einige sequenziert.

Die erhaltene DNA-Sequenz des Plasmids pBK-PGA sowie die daraus abgeleitete Proteinsequenz ergaben große Homologien zu bereits bekannten Asparaginasen. Dabei zeigte der Vergleich mit der Glutaminase-Asparaginase (PGA) aus *Pseudomonas sp.7A* mit 84,8 % Übereinstimmung auf Proteinebene die größte Homologie. Der Vergleich der Proteinsequenzen ergab außerdem, daß ca. 45 Aminosäuren am N-terminalen Ende fehlten. Eine genauere Analyse der DNA-Sequenz zeigte eine interne *Sau3AI*-Schnittstelle bei Aminosäure 59 (*E. coli*-Numerierung). Durch diese natürlich vorhandene *Sau3AI*-Schnittstelle war das Gen bereits unvollständig bei der Genbankherstellung in die Phagenarme ligiert worden. Auch die Sequenzierung weiterer subklonierter Inserts lieferte das gleiche Ergebnis.

Da die Wahrscheinlichkeit relativ groß war, daß auch weitere aus der Genbank erhaltene Klone interne *Sau3AI*-Schnittstellen aufwiesen, wurde der noch fehlende Teil der Sequenz mit Hilfe der „Genome Walker PCR“ ermittelt. Diese Methode ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Bereichen, die stromaufwärts oder stromabwärts von einem bereits bekannten Genabschnitt liegen. Dazu wurden aus genomischer DNA von *P. fluorescens* durch Restriktion mit *DraI*, *PvuII*, *SspI*, *EcoRV* und *ScaI* fünf Genom-Bibliotheken angelegt, die jeweils Fragmente aus der entsprechenden Restriktion enthielten. Die DNA-Fragmente wurden mit den Adaptern ADA 1 und ADA 2 ligiert. Durch eine anschließende PCR mit einem spezifischen Adapterprimer ADP und dem genspezifischen Primer PR 2 wurden aus der *PvuII*- und der *SspI*-Bank Fragmente von ca. 700 bp und 750 bp erhalten. Es wurden noch weitere Fragmente erhalten. Diese waren jedoch zu klein oder enthielten zu wenig DNA, so daß sie nicht sequenziert wurden. Das *PvuII*- und das *SspI*-Fragment wurden aus einem Agarosegel isoliert, aufgereinigt und von Primer PR 2 aus sequenziert. Die Länge der erhaltenen Sequenzen betrug 649 bp (*PvuII*-Fragment) und 640 bp (*SspI*-Fragment). Abgesehen von den 9 bp, um die das *PvuII*-Fragment größer war, stimmten die beiden Sequenzen vollständig überein. Die beiden Sequenzen enthielten den noch fehlenden vorderen Bereich des Asparaginasegens sowie noch 295 bp (*PvuII*-Fragment) stromaufwärts vom Translationsstart. Aufgrund der gewonnenen Sequenzinformation wurden die zwei genspezifischen Primer PSGA 1 und PSGA 2 synthetisiert, mit denen das gesamte Gen über PCR amplifiziert wurde. Der Primer PSGA 1 liegt 34 bp stromaufwärts vom ATG-Startcodon und enthält eine natürlich vorkommende *Xba I*-Schnittstelle. Der Primer PSGA 2 liegt 89 bp stromabwärts vom Stopcodon und enthält eine künstliche *EcoRI*-



Schnittstelle. Über diese beiden Schnittstellen wurde das amplifizierte Fragment in den Vektor pBluescript SK(+) kloniert, wodurch das Plasmid pB-PGA erhalten wurde. Eine Sequenzierung des Plasmids ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der aus der Genbank erhaltenen Sequenz und mit der Sequenz, die aus der Genome Walker PCR ermittelt worden war. Die Gesamtsequenz der *P. fluorescens* Glutaminase-Asparaginase (Pf-GA), sowie die Bereiche, die durch die „Genome Walker PCR“ erhalten wurden, und der Bereich hinter dem *P. fluorescens ansB*-Gen sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Demnach ist das *ansB*-Gen 1086 bp groß. Das von dieser Sequenz abgeleitete Protein besteht aus 362 Aminosäuren.

```

1  AACGACAGGGCATCTGCCCCACCGTCAAACACGCCTGCATGAATATTCCATCATGGTTTT
61  CGGACAACCGAACGCAATAGCCCCCTCACTGTTTCGAAAGCCGGACAAACGCCCTCAGCC
121 CCACCTGCAAAAACCAATATAAGTTGTTTTAAATCAACACGTTAATTTATATGTTTCGGCC
      -24      -12      +1
181 ACCATCAGCCTGGTTACAAATCCTGCTCTTTTCTCAGCACCTCGCGGCATTCAGAATCGCCC
      PSGA 1                                RBS
241 GGGTGTCTTAGATGAACCTGCTACCGCACTCATCAAAAACCAGAGAGAAAAATAATGAAA
      G C S R * T C Y R T H Q K P E R K I M K 2
301 TCTGCACTGAAAACCTTCGTTCCGGGCGCCCTAGCCCTACTGCTGCTGTTCCCGTTGCT
      S A L K T F V P G A L A L L L L F P V A 22
361 GCCCAGGCAAAGGAAGTCGAAACCAAGACCAAGCTGGCCAACGTGGTGATTCTCGCCACC
      A Q A K E V E T K T K L A N V V I L A T 42
421 GGCGGGACCATTGCCGGCGCCGGCGCCAGCGCCGCAACAGCGCCACCTACCAGGCGGCC
      G G T I A G A G A S A A N S A T Y Q A A 62
481 AAGGTCGGTATCGAGCAATTGATCGCCGGTGTCTCTGAGCTTAGCCAGATCGCCAATGTC
      PR 1
      K V G I E Q L I A G V P E L S Q I A N V 82
541 CGCGGCGAGCAAGTGATGCAAATTGCGTCCGAGAGCATCAACAACGAAAACCTTCTGCAG
      R G E Q V M Q I A S E S I N N E N L L Q 102
601 TTGGGTCGCCGAGTAGCCGAACCTGGCTGACAGCAAGGACGTGGACGGCATCGTTATCACC
      GSP 2                                PR 2
      L G R R V A E L A D S K D V D G I V I T 122
661 CACGGTACCGACACCCTCGAAGAAACCGCTTACTTCTGAACCTTGTGAAAAGACCGAC
      H G T D T L E E T A Y F L N L V E K T D 142
721 AAGCCAATCATCGTCGTCGGTTCAATGCGTCTGGTACCGCCATGTCGGCTGACGGCATG
      K P I I V V G S M R P G T A M S A D G M 162
781 CTCAACCTGTACAACGCCGTGGCTGTGCGCGGCAGCAAAGACGCTCGCGGCAAGGGTGTA
      L N L Y N A V A V A G S K D A R G K G V 182
841 CTGGTCACCATGAACGATGAGATCCAATCGGGTTCGCGACGTCAGCAAAATGATTAACATC
      L V T M N D E I Q S G R D V S K M I N I 202
901 AAGACCGAAGCATTCAAAAGCCCGTGGGGCCCGTTGGGCATGGTCGTTGAAGGCAAATCC
      K T E A F K S P W G P L G M V V E G K S 222
961 TATTGGTTCGCTTGCCCTGCCAAGCGGCACACCATGGATTCCGAGTTTCGACATCAAGACC
      Y W F R L P A K R H T M D S E F D I K T 242
1021 ATCAAAAGCCTGCCAGACGTGGAATCGCCTACGGCTACGGCAACGTGAGCGACACCGCC
      I K S L P D V E I A Y G Y G N V S D T A 262
1081 GTCAAGGCCCTGGCCAGGCCGGTGCCAAAGCCATCATCCATGCCGGCACCGGCAATGGT
      V K A L A Q A G A K A I I H A G T G N G 282
1141 TCGGTGTCTTCCAAAGTCGTCCTGCCCTGCAGAACTGCGCAAGCAAGGCGTCAAATC
      S V S S K V V P A L Q E L R K Q G V Q I 302
1201 ATTCGCTCTTCCACGTGAATGCCGGCGGTTTCGTTCTGCGTAATGCTGAACAGCCTGAC
      I R S S H V N A G G F V L R N A E Q P D 322
1261 GACAAGTACGACTGGGTTGTCGCACACGACCTTAACCCACAGAAAGCCCGCATCTTGCA
      D K Y D W V V A H D L N P Q K A R I L A 342
1321 ATGGTTGCCCTGACCAAGACCCAGGACAGCAAAGAATTGCAACGGATGTTCTGGGAATAT
      M V A L T K T Q D S K E L Q R M F W E Y 362
1381 TGATTGTTGGTGACACCGGTAGAGGCGGGCTTGCTTGCTCTACTTCCCCGCTCGCCCCCT
      * L L V T P V E A G L L A S T S P L A P -
      PSGA 2
1441 CGCTACACATTCCCCGCGCGACACCCGCTGTCTGAATGGACCGTCAAAACCAACTGGCTT

```

Abb. 4.1 DNA- und Proteinsequenz der *P. fluorescens* Glutaminase-Asparaginase

Die Consensus-Sequenzen des  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotors (-24 / -12) sind fett gedruckt und unterstrichen. Der Transkriptions- und Translationstartpunkt sind fett gedruckt. Das Signalpeptid ist grau unterlegt und Reste mit katalytischer Funktion sind eingerahmt. Folgende Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet: PR1 und PR2 (=Sondenprimer), PSGA1 und PSGA2 (Primer zur Amplifizierung des Gens durch PCR), GSP1 und GSP2 (zusammen mit PR2; Primer zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch 5'RACE (vgl. 4.10)).

#### 4.4 Analyse des *ansB*-Gens

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit der *Glutaminase-Asparaginase* aus *Pseudomonas sp.* 7A und *AnsB* aus *E. coli* ergab Identitäten von 85 % und 49 %. Die Ähnlichkeit beträgt 88 % und 58 %. Weitere Übereinstimmungen mit bekannten Asparaginasen des Typs II sind in Tabelle 4.3 und 4.4 zusammengefaßt.

Tabelle: 4.3 Übereinstimmung mit der Pf-GA auf DNA-Ebene

Mikroorganismus	Gen	Ähnlichkeit [%]	Identität [%]	Länge der Übereinstimmung [bp]
<i>E. coli</i>	<i>ansB</i>	57	57	980
<i>Wollinella succinogenes</i>	<i>ansA</i>	59	59	750
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>asn</i>	59	59	962
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>aspI</i>	61	61	272
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>ansA</i>	65	65	107
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>ansA</i>	60	60	104

Tabelle:4.4 Übereinstimmung mit der Pf-GA auf Proteinebene

Mikroorganismus	Protein	Ähnlichkeit [%]	Identität [%]	Länge der Übereinstimmung [AS]
<i>Pseudomonas sp.</i> 7A	PGA	88	85	337
<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>	<i>Glutaminase-Asparaginase</i>	70	63	330
<i>E. coli</i>	L-Asparaginase II	58	49	330
<i>W. succinogenes</i>	Asparaginase	58	48	327
<i>E. chrysanthemi</i>	L-Asparaginase	56	46	349
<i>S. cerevisiae</i>	intrazelluläres Isozym der L-Asparaginase	46	35	331
<i>B. licheniformis</i>	Asparaginase	41	30	321
<i>B. subtilis</i>	L-Asparaginase	42	31	177

Das Alignment in Abbildung 4.2 zeigt einen Vergleich der Pf-GA mit bekannten Asparaginasen des Typs II. Wie das Alignment zeigt, ist die Pf-GA den anderen bekannten L-Asparaginasen in ihrer Sequenz sehr ähnlich. Die größten Übereinstimmungen finden sich mit der PGA aus *Pseudomonas sp.* 7A. Diese große Ähnlichkeit ist sicher auf die nahe Verwandtschaft der beiden *Pseudomonas*-Stämme zurückzuführen. Die Aminosäurereste, in denen die Pf-GA nicht mit der PGA

Abb. 4.2: Vergleich der abgeleiteten *P. fluorescens* Glutaminase-Asparaginase-Sequenz mit Aminosäuresequenzen von L-Asparaginasen des Typs II

	1				T-12		Y-25
Pf-GA	MKSALKTFVP	GALALLLLFP	VAAQAKEVET	KTKLANVVIL	ATGGTLAGAG	ASAANSATYQ	
PGA	.....	.....	.....KEVEN	QQKLANVVIL	ATGGTLAGAG	ASAANSATYQ	
EcAnsB	.....	.MEFFKKTAL	AALVMGFSGA	ALALPNITIL	ATGGTLAGGG	DSATKSN.YT	
AGA	.....	.....	.....	...KNVVIV	ATGGTLAGAG	ASSTNSATYS	
WA	.....	.....	.....	.MAKPQVTIL	ATGGTLAGSG	ESSVKSS.YS	
ErA	.....M	ERWFKSLFVL	VLFFVFTASA	ADKLPNIVIL	ATGGTLAGSA	ATGTQTTGYK	
	61			S-58			120
Pf-GA	AAKV	GIEQLI	AGVPELSQIA	NVRGEQVMQI	ASESINNENL	LQLGRRVAEL	ADSKDVDGIV
PGA	AAKV	GVDKLI	AGVPELADLA	NVRGEQVMQI	ASESITNDDL	LKLGRVAEL	ADSNDVDGIV
EcAnsB	VGKVG	VENLV	NAVPLQKDIA	NVKGEQVVNI	GSQDMNDNVW	ITLAKKIN..	TDCDKTDGIV
AGA	AAKV	PVDALI	KAVPQVNDLA	NITGIQALQV	ASESITDKEL	LSLARQVNDL	VKKPSVNGVV
WA	AGAVT	VDKLL	AAVPAINDLA	TIKGEQISSI	GSQEMTGKVV	LKLAKRVNEL	LAQKETEAVI
ErA	AGALG	VDTLI	NAVPEVKKLA	NVKGEQFSNM	ASENMTGDVV	LKLISQRVNEL	LARDDVDGVV
	D-90						
	121	T-89					180
Pf-GA	ITHGTD	TLLEE	TAYFLNLVEK	TDKPIIVVGS	MRPGTAMSAD	GMLNLYNAVA	VAGSKDARGK
PGA	ITHGTD	TLLEE	TAYFLDLTLN	TDKPIIVVGS	MRPGTAMSAD	GMLNLYNAVA	VASNKDSRGK
EcAnsB	ITHGTD	TMEE	TAYFLDLTVK	CDKPVVMVGA	MRPSTSMSAD	GPFNLYNAV	TAADKASANR
AGA	ITHGTD	TMEE	TAFFLNLVVH	TDKPIVLVGS	MRPSTALSAD	GPLNLYSAVA	LASSNEAKNK
WA	ITHGTD	TMEE	TAFFLNLTVK	SQKPVVLVGA	MRPGSSMSAD	GPMNLYNAV	VAINKASTNK
ErA	ITHGTD	TVEE	SAYFLHLTVK	SDKPVVVFVAA	MRPATAISAD	GPMNLLEAVR	VAGDKQSRGR
	181		K-162				240
Pf-GA	GVLVTM	NDEI	QSGRDVSKMI	NIKTEAFKS.	PWGPLGMVVE	GKSYWFRLLPA	KRHTMDSEFD
PGA	GVLVTM	NDEI	QSGRDVSKSI	NIKTEAFKS.	AWGPLGMVVE	GKSYWFRLLPA	KRHTVNSEFD
EcAnsB	GVLVVM	NNDTV	LDGRDVTKTN	TTDVATFKSV	NYGPLGYIHN	GKIDYQRTPA	RKHTSDTPFD
AGA	GVMVLM	NDSI	FAARDVTKGI	NIHTHAFVS.	QWGALGTLVE	GKPYWFRSSV	KKHTNNSEFN
WA	GVVIVM	NDEI	HAAREATKLN	TTAVNAFASP	NTCKIGTVYY	GKVEYFTQSV	RPHTLASEFD
ErA	GVMVVL	NDRI	GSARYITKTN	ASTLDTFKAN	EEGYLGVIIG	NRIYYQNRID	KLHTTRSVFD
	241					N-248	300
Pf-GA	IKTIK..	SLP	DVEIAYGYGN	VSDTAVKALA	QAGAKALIHA	GTGNGSVSSK	VVPALQELR.
PGA	IKQIS..	SLP	QVDIAYSIGN	VTDTAYKALA	QNGAKALIHA	GTGNGSVSSR	LTPALQTLR.
EcAnsB	VSKLN..	ELP	KVGIVYNYAN	ASDLPAKALV	DAGYDGIIVSA	GVGNGNLYKS	VFDTLATAA.
AGA	IEKIQGDALP		GVQIVYGSDN	MMPDAYQAF	KAGVKALIHA	GTGNGSMANY	LVPEVRKLHD
WA	ISKIE..	ELP	RVDILYAHPD	DTDVLVNAAL	QAGAKGIHA	GMGNGNPFPL	TQNALEKAA.
ErA	VRGLT..	SLP	KVDILYGYQD	DPEYLYDAI	QHGVKGIIVYA	GMGAGSVSVR	GIAGMRKAM.
	301		E-283				360
Pf-GA	KQGVQI	IRSS	HVNAGGFVLR	NAEQPDDKYD	WVVAHDLNPQ	KARILAMVAL	TKTQDSKELO
PGA	KTGTQI	IRSS	HVNQGGFVLR	NAEQPDDKND	WVVAHDLNPE	KARILVELAM	VKTQDSKELO
EcAnsB	KTGTAV	VRSS	RVPTG.ATTQ	DAEVDLAKYG	FVASGTLNPQ	KARVLLQAL	TQTKDPQIQ
AGA	EQQLQI	VRSS	RVAQG.FVLR	NAEQPDDKYG	WIAAHDLPQ	KARLLMALAL	TKTNDAKEIQ
WA	KSGVVV	ARSS	RVGSG.STTQ	EAQVDLKKLG	FVATESLNPQ	KARVLLMLAL	TKTSDREAIQ
ErA	EKGVVV	IRST	RTGNG.IVPP	DEELPG....	.LVSDSLNPA	HARILLMLAL	TRTSDPKVIO
	361	366					
Pf-GA	RMFWEY						
PGA	RIFWEY						
EcAnsB	QIFNQY						
AGA	NMFWNY						
WA	KIFSTY						
ErA	EYFHTY						

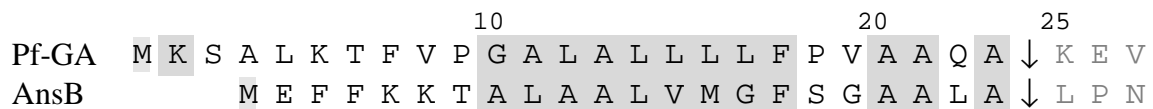
gelb: Reste mit katalyt. Funktion; rot: konservierte AS; fett gedruckt = erste Aminosäure des (reifen) Proteins; Pf-GA = *P. fluorescens* WT GA; PGA = *Pseudomonas* sp.7A-GA; EcAnsB = *E. coli* Asparaginase II; AGA = *A. glutaminasificans*-Asparaginase; ErA = *E. chrysanthemi*-Asparaginase; WA = *W. succinogenes*-Asparaginase; Signalpeptide sind unterstrichen

übereinstimmt, sind meistens sehr ähnlich (Austausch von Isoleucin gegen Leucin und Isoleucin gegen Valin) oder zumindest ähnlich (Austausch von Valin gegen Leucin) in ihren Eigenschaften, so daß dadurch wahrscheinlich keine größeren Strukturunterschiede auftreten. Im folgenden bezieht sich die Numerierung der Aminosäuren auf die *E. coli*-Asparaginase II. Alle Aminosäuresequenzen enthalten zwischen Threonin-9 und Alanin-14 die gleiche Aminosäuresequenz TGGTIA. Ebenfalls hochkonserviert ist die Region um Aspartat-90 (THGTD T). Auch weitere hochkonservierte Bereiche stimmen mit den anderen Asparaginasen überein. Alle Reste, denen aufgrund von Untersuchungen an der Asparaginase II aus *E. coli* (AnsB) katalytische Funktionen zugeordnet wurden [Wehner *et al.*, 1994], sind bis auf Asparagin-248 in der Pf-GA konserviert. Diese Reste sind in der Abbildung 4.2 gelb unterlegt.

#### 4.5 Identifizierung eines Signalpeptids der Pf-GA

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der Pf-GA und der PGA aus *Pseudomonas sp.* 7A zeigt, daß die Pf-GA-Sequenz 24 Aminosäuren länger ist. Auch die von *ansB* abgeleitete Aminosäuresequenz ist länger.

Das Alignment in Abbildung 4.2 zeigt, daß die Aminosäuresequenzen bis Aminosäure-22 (*E. coli*-Numerierung) nicht übereinstimmen. Bei einigen Sequenzen fehlt der vordere Bereich ganz. Von AnsB ist bekannt, daß es sich um ein periplasmatisches Enzym handelt. Periplasmatische Proteine erhalten während ihrer Synthese im Cytosol sogenannte Signalsequenzen. Diese Sequenzen sorgen dafür, daß die Proteine, teilweise schon während ihrer Synthese, ins Periplasma transportiert werden. Dort werden die Signalsequenzen von Signalpeptidasen abgespalten. Die Signalsequenz von AnsB ist bekannt. Sie umfaßt 22 Aminosäuren. Die Schnittstelle für die Signalpeptidase liegt zwischen Alanin-22 und Leucin-23. Aufgrund der Sequenzhomologien mit AnsB sowie der Tatsache, daß durch proteinchemische Untersuchungen eine Asparaginase-Aktivität im Periplasma von *P. fluorescens* nachgewiesen werden konnte [Klöppner, 1999], wird vermutet, daß es sich bei der klonierten Pf-GA ebenfalls um ein periplasmatisches Enzym handelt. Deshalb wurde der vordere Bereich der Sequenz nach Schnittstellen für Signalpeptidasen durchsucht. Dazu wurde das Programm „Signalseq“ (HUSAR, DKFZ



Die Sequenz der reifen Pf-GA beginnt also erst bei Aminosäure 26. Wie das Alignment in Abbildung 4.2 zeigt, stimmt ab diesem Lysin-Rest die Sequenz mit der Sequenz der PGA aus *Pseudomonas sp.* 7A sehr gut überein. Der Grund für das Fehlen der Signalsequenz in der PGA aus *Pseudomonas sp.* 7A ist, daß diese Sequenz aufgrund einer Aminosäuresequenzierung erhalten wurde. Im Folgenden wird die Numerierung der Pf-GA bei diesem Lysin-Rest mit 1 beginnen.

#### 4.6 Vergleich der von dem *ansB*-Gen aus *P. fluorescens* erhaltenen Sequenz mit der Aminosäuresequenz des nativ gereinigten Proteins

88

klonierten Pf-GA um ein periplasmatisches Enzym handelt. Das gereinigte Enzym wird durch Glutamat, Asparagin und Glutamin als einziger C- und N-Quelle induziert und durch Ammoniumchlorid und Glucose reprimiert [Kloppner, 1999].

#### 4.7 Identifizierung eines Endonukleasegens

Eine Restriktionsanalyse des aus der Genbank erhaltenen Plasmids pBK-PGA zeigte, daß das Insert in dem pBK-CMV-Phagemid (pBK-PGA) ca. 2,5 kb groß war. Deshalb wurde mit einem weiteren Primer, der stromabwärts von dem *ansB*-Gen hybridisierte, eine zusätzliche Sequenzierung durchgeführt. Es wurden noch ca. 1650 bp sequenziert. In diesem Bereich wurde nach weiteren offenen Leserahmen gesucht. 447 bp stromabwärts vom *ansB*-Stopcodon wurde ein vollständiger offener Leserahmen von 687 bp gefunden. Das von dieser Sequenz abgeleitete Protein besteht aus 229 Aminosäuren. Datenbankvergleiche mit Hilfe der Programme BLASTN, BLASTP, BLASTX und TBLASTN (HUSAR; DKFZ Heidelberg) zeigten sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene Ähnlichkeiten zu extrazellulären DNasen aus *Aeromonas hydrophila* und *Vibrio cholerae*, zur Endonuclease I aus *E. coli* und zu einer Nuclease aus *E. chrysanthemi*. Die Ähnlichkeiten mit den genannten Enzymen betragen zwischen 65 und 67 % auf DNA-Ebene und zwischen 39 und 45 % auf Proteinebene. Die Identitäten liegen zwischen 65 und 67 % auf DNA- und zwischen 34 und 40 % auf Proteinebene, wobei die Länge der übereinstimmenden Sequenzen zwischen 203 und 217 Aminosäuren beträgt. Deshalb wurde das Gen mit *endX*, für eine Endonuklease mit noch nicht bekannter Funktion, bezeichnet. Die DNA- und Proteinsequenz des *endX*-Gens, sowie ein Vergleich mit den oben genannten Nukleasen sind in den Abbildungen A.1 und A.2 im Anhang dargestellt. Die Genkarte in Abbildung 4.4 zeigt die Lage der beiden Gene zueinander auf dem Chromosom.

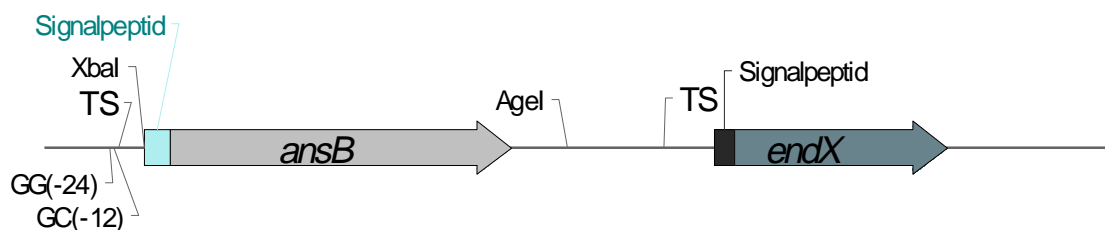


Abb. 4.4: Genkarte des *ansB*- und *endX*-Gens

TS = Transkriptionsstartpunkt; GG (-24) und GC (-12) = Consensus-Sequenzen des  $\sigma^{54}$ -Promotors

## 4.8 Überexpression und Reinigung der rekombinanten Pf-GA-His<sub>8</sub>

Die proteinchemischen Untersuchungen der Pf-GA wurden stets mit lebenden Zellen durchgeführt. Obwohl der angewendete Aktivitätstest mit L-Asparat- $\beta$ -hydroxamat (AHA) spezifisch für die periplasmatische Asparaginase ist, können Ungenauigkeiten nicht ganz ausgeschlossen werden. Eine weitere cytosolisch lokalisierte Asparaginase könnte die Aktivitätsbestimmung des periplasmatischen Enzyms verfälschen, wenn Zellen während oder vor der Messung absterben. Bei der nachfolgenden Lyse der Zellen würde die cytosolische Asparaginase freigesetzt und könnte mit dem AHA-Substrat reagieren und dadurch die Meßwerte verfälschen.

Für eine genaue Charakterisierung wurde versucht, die Pf-GA in einen Überexpressionsvektor zu klonieren. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pASK-C [Bader *et al.*, 1996] gewählt. Dieser Vektor ist so konstruiert, daß ein „Histidintag“ aus 8 Histidinresten während der Expression an das C-terminale Ende des Proteins angehängt wird. Dadurch wird eine Reinigung über „immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie“ (IMAC) ermöglicht. Die Klonierung ergab das Plasmid pASK-C/PGA (s. Abb. 4.5). Die Expression erfolgte wie in Abschnitt (Methodenteil) beschrieben. Zur Überprüfung der Expression wurde jeweils vor Induktion, sowie 1, 2, 3, 4 und 5 h nach Induktion Proben aus der Kultur entnommen und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Parallel dazu wurden Proben aus einer Kontrollkultur, die nicht induziert worden war, entnommen und ebenfalls auf dem SDS-Gel aufgetragen. Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE. Auf dem Gel ist die Überexpression eines Proteins mit einer Masse etwas oberhalb von 36 kDa deutlich zu sehen. Aufgrund der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz für die Pf-GA wurde eine Masse von 38,7 kDa berechnet. Allerdings ist auch in der nicht-induzierten Kontrollkultur eine, wenn auch schwächere, Expression des Proteins zu erkennen. Das bedeutet, daß der Promotor nicht vollständig von dem Repressor blockiert war. Obwohl dadurch die Expression nicht unter optimalen Bedingungen induziert werden konnte, war die Überexpression der Pf-GA zufriedenstellend. Gereinigt wurde die überexprimierte Pf-GA zunächst über TALONspin-Säulen, wobei das Protein mit einem pH-Gradienten eluiert wurde. Allerdings enthielt die auf diese Weise gereinigte Pf-GA noch geringe Verunreinigungen. Deshalb wurde zusätzlich eine FPLC-Reinigung über Ni-NTA-Agarose durchgeführt.



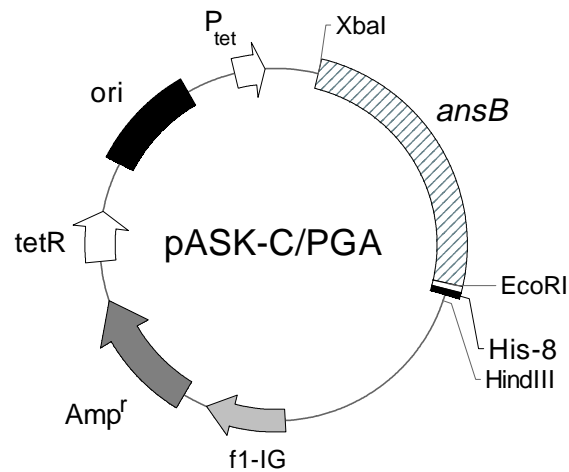


Abb. 4.5: Expressionsvektor pASK-C/PGA

ori = Replikationsursprung; Amp<sup>r</sup> =  $\beta$ -Lactamasegen, vermittelt Ampicillin-Resistenz; *ansB* = *ansB*-Gen; tetR = Tet-Repressorgen; P<sub>tet</sub> = Tet-Promotor; f1-IG = intergenische Region des Phagen f1

Mit Hilfe dieses Verfahrens ließ sich das Protein durch Elution mit 500 mM Imidazol sauber erhalten. Auf dem SDS-Gel in Abbildung 4.7 ist das gereinigte Protein, sowie das Pellet und der Überstand des Ultraschallaufschlusses gezeigt. Zusätzlich wurden noch Proben von vor der Induktion und nach 5 h Expression aufgetragen.

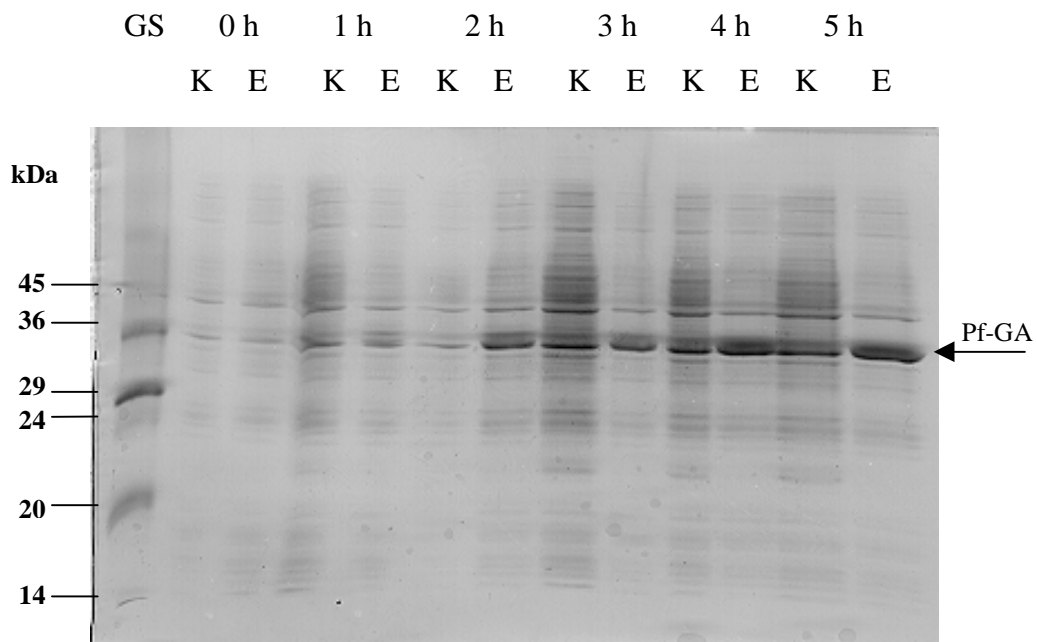


Abb. 4.6: Überexpression der rekombinanten Pf-GA-His<sub>8</sub>

GS = Größenstandard; 0, 1, 2, 3, 4, 5 h = Expressionsdauer; K = Kontrollkultur; E = Expressionskultur

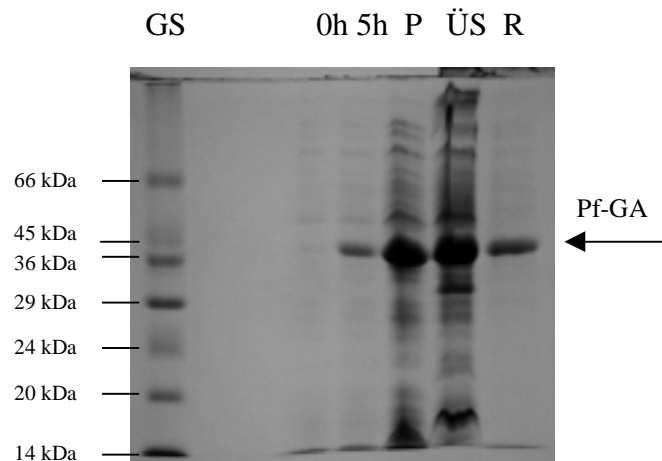


Abb.4.7: Überexpression und Reinigung der rekombinanten Pf-GA-His<sub>8</sub>

GS =Größenstandard; 0 h = vor Induktion; 5 h = nach 5 h Expression; P = Pellet nach Ultraschallaufschluß; ÜS = Überstand nach Ultraschallaufschluß; R = gereinigtes Protein

#### 4.9 Bestimmung der Substratspezifität der rekombinanten Pf-GA-His<sub>8</sub>

Um zu testen, ob die rekombinante Pf-GA die gleiche Substratspezifität und Aktivität wie das nativ gereinigte Enzym besaß, wurden gekoppelte Aktivitätstests mit L-Asparagin, D-Asparagin und L-Glutamin als Substrate durchgeführt. Bei diesem Test werden die bei der Pf-GA-Reaktion entstehenden Ammoniumionen direkt weiter mit  $\alpha$ -Ketoglutarat, NADH und einem Überschuß Glutamat-Dehydrogenase zu Glutamat umgesetzt. Dabei wird die Abnahme des NADH durch Extinktionsmessung bei 340 nm verfolgt. Für die Bestimmung der Substratspezifität wurden jeweils 18 mM der Substrate mit 10  $\mu$ l gereinigter Pf-GA-His<sub>8</sub>, 8 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 333  $\mu$ M NADH und 2,6 units Glutamat-Dehydrogenase umgesetzt. Die drei Substrate werden alle von der rekombinanten Pf-GA umgesetzt, aber mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Setzt man die Umsatzrate von L-Asparagin gleich 100 %, so erhält man für Glutamin eine Umsatzrate von 141 % und für D-Asparagin von 46 %. Diese Werte stimmten sehr gut mit den Umsatzzaten des nativ gereinigten Enzyms, von 100 % für L-Asparagin, 40 % für D-Asparagin und 150 % für L-Glutamin überein [Kloppner, 1999]. Dadurch wurde die Identität der beiden Enzyme noch einmal bestätigt.

#### 4.10 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *ansB*-Gens

Um den Transkriptionsstartpunkt des *ansB*-Gens zu bestimmen, wurde eine 5'-RACE durchgeführt. Dazu wurde aus einer *P. fluorescens*-Übernachtskultur Gesamt-RNA isoliert. Mit dem genspezifischen Primer PR 2, der auch für die DIG-Markierung der Asparaginase-Sonde eingesetzt wurde, synthetisierte man mit einer Reversen Transkriptase einen cDNA-Strang. Der Primer PR 2 wurde deshalb gewählt, da er einerseits den DNA-Bereich abdeckt, der über dem hochkonservierten Aminosäurebereich H-87 / M-92 liegt, so daß er sehr spezifisch ist. Andererseits entstand dadurch eine cDNA, die mindestens 360 bp lang war. Dadurch wurde gewährleistet, daß man bei den nachfolgenden PCRs ein DNA-Fragment erhielt, das groß genug und deshalb auf Agarosegelen gut zu identifizieren war. Nach Abbau der RNA und Aufreinigung des cDNA-Stranges, wurde am 3'-Ende mit Hilfe einer Terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase eine Oligo-dC-Ankersequenz angehängt. Mit einem zweiten genspezifischen Primer GSP 2, der 35 bp stromaufwärts von PR 2 hybridisiert, und einem spezifischen Ankerprimer AAP für die Oligo-dC-Sequenz wurde die Zweitstrangsynthese und Amplifizierung der cDNA durchgeführt. Durch eine weitere PCR mit dem Primer GSP 3, der 170 bp stromaufwärts von GSP 2 mit der cDNA hybridisierte und einem abgekürzten universellen Ankerprimer AUAP, wurde die cDNA noch einmal amplifiziert. Über die durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen *Xba*I (GSP 3) und *Sal*I (AUAP) wurde das erhaltene PCR-Fragment in den Vektor pBluescript SK (+) kloniert und sequenziert. Über Sequenzvergleiche mit pBluescript SK (+) und dem *ansB*-Gen wurde der Transkriptionsstartpunkt 79 bp stromaufwärts vom ATG-Startcodon identifiziert. Der Transkriptionsstartpunkt und die DNA-Bereiche, mit denen die eingesetzten Primer hybridisieren, sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

#### 4.11 Promotoridentifizierung

Nachdem der Transkriptionsstartpunkt eindeutig bestimmt worden war, wurde in dem stromaufwärtsliegenden DNA-Bereich nach Consensus-Sequenzen für Promotoren gesucht. Solche Consensus-Sequenzen werden von den  $\sigma$ -Untereinheiten der RNA-Polymerasen erkannt und ermöglichen die Anlagerung der RNA-Polymerase an die

DNA. Es gibt verschiedene RNA-Polymerasen, die sich nur in der Größe ihrer  $\sigma$ -Untereinheit unterscheiden. Die allgemeine Untereinheitenstruktur von RNA-Polymerasen ist:  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ . Die in Prokaryoten am häufigsten auftretende RNA-Polymerase besitzt eine  $\sigma^{70}$ -Untereinheit. Diese Untereinheit erkennt Consensus-Sequenzen in der Region um die Positionen -10 (= TATAAT) und -35 (= TTGACA). Eine Untersuchung der stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegenden DNA-Region ergab jedoch keine Übereinstimmung mit -10 und -35 Consensus-Sequenzen für die  $\sigma^{70}$ -RNA-Polymerase. Eine weitere RNA-Polymerase der Prokaryoten besitzt eine  $\sigma^{54}$ -Untereinheit und bindet an Promotoren, deren Consensus-Sequenz sich stark von denen der  $\sigma^{70}$ -Promotoren unterscheiden [Collado-Vides *et al.*, 1991]. Diese  $\sigma^{54}$ -Promotoren wurden kommen seltener als  $\sigma^{70}$ -Promotoren vor, wurden aber schon bei vielen vor allem an der Stickstoff-Fixierung beteiligten Genen identifiziert. Die  $\sigma^{54}$ -Promotoren besitzen zwei hochkonservierte Motive bei -24 (GG) und -12 (GC). Auch der Bereich zwischen diesen Motiven ist genau definiert [Fischer *et al.*, 1994; Beynon *et al.*, 1983; Thöny *et al.*, 1989]. Eine Untersuchung der *P. fluorescens* DNA-Sequenz stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung mit -24/-12-Regionen bekannter  $\sigma^{54}$ -Promotoren. Dieser Bereich erfüllte alle Sequenzbedingungen für einen  $\sigma^{54}$ -Promotor [Beynon *et al.*, 1983; Ausubel F.M., 1984]. In Abbildung 4.8 ist dieser Sequenzbereich des *ansB*-Gens von *P. fluorescens* dargestellt.

Abb. 4.8: Consensus-Sequenzen und Promotorbereich des *P. fluorescens ansB*-Gens

<i>nif</i> -Promotor-Consensus*:	CT	GG	- N <sub>8</sub> -	CT	GC	A	N <sub>9</sub>	Py
		-24			-12			+1
<i>ansB</i> -Consensus:	ACCATCAGCCT	GG	TACAAATCCT	GC	TCTTTCTCAGC			
	-35				-10			+1
Vgl. $\sigma^{70}$ -Promotor:	TC	TTGACA	T	- N <sub>11-15</sub> -	TATAAT		-N <sub>5-8</sub> - (ACGT)**	

Abb.: Vergleich der *P. fluorescens ansB*-Promotorsequenz mit der Consensus-Sequenz von  $\sigma^{54}$ -Promotoren und mit der  $\sigma^{70}$ -Consensus-Sequenz aus *E. coli*  
 Py = Pyrimidinbase  
 \* Diese -24/-12-Consensus-Sequenz beruht auf Untersuchungen von *nif*-Promotorsequenzen von *K. pneumoniae* [Beynon *et al.*, 1983].  
 \*\* An der Stelle +1 können alle Basen auftreten.

#### 4.12 Bestimmung der *ansB*-Transkriptgröße durch Northernblot-Analyse

Um festzustellen, ob das *ansB*-Gen monocistronisch oder zusammen mit dem Endonukleasegen abgelesen wird, das 447 bp stromabwärts von dem *ansB*-Gen liegt, wurde eine Northernblot-Analyse durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob verschiedene Kulturmedien die Expression des *ansB*-Gens induzieren oder reprimieren. Dazu wurden sowohl von *P. fluorescens* (DSM WT), als auch von *P. putida* Kulturen in  $M9^+$  ( $M9$ -Minimalmedium mit 18,6 mM  $NH_4Cl$  und 22 mM Glucose) und  $M9^-$ -Glutamat-Medium ( $M9$ -Minimalmedium ohne  $NH_4Cl$ , ohne Glucose aber mit 5 mM Glutamat) angezogen und die Gesamt-RNA isoliert. Gleiche Mengen RNA wurden unter denaturierenden Bedingungen auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *ansB*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Zur Herstellung der RNA-Sonde wurde das in pBluescript II SK(+) klonierte *ansB*-Gen (Plasmid pB-PGA) verwendet. Das *ansB*-Gen wurde mit *PvuII* so aus dem Plasmid geschnitten, daß noch größere Bereiche Plasmid-DNA mit den T7- und T3-Promotorsequenzen auf dem *ansB*-Fragment lagen. Dieses DNA-Fragment wurde isoliert, aufgereinigt und als Template für die *in vitro*-Transkription mit gleichzeitiger DIG-Markierung eingesetzt. Die durch die *in vitro*-Transkription vom T3-Promotor hergestellte mRNA entsprach dem natürlichen Transkript des *ansB*-Gens. Da mit dieser Sonde kein spezifisches Hybridisierungssignal erwartet wurde, konnte diese Sonde nur als Negativkontrolle eingesetzt werden. Die RNA-Sonde, die durch Transkription vom T7-Promotor aus hergestellt wurde, war komplementär zu dem natürlichen Transkript und wurde als spezifische Sonde für die Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter hochstringenten Bedingungen bei 68 °C in DIG Easy Hyb-Lösung (Boehringer Mannheim). In mehreren Experimenten wurde eine hybridisierende Bande von ca. 1,2 kb identifiziert (s. Abb. 4.9), wie sie bei einer monocistronischen Transkription des *ansB*-Gens erwartet wurde. Wie das Bild des Northernblots zeigt (Abb. 4.9), ist das Hybridisierungssignal mit der RNA, die aus der  $M9^-$ -Glutamat-Kultur gewonnen wurde, sehr stark. Das Signal mit der RNA aus der  $M9^+$ -Kultur ist dagegen sehr schwach. Bei *P. putida* war bei der RNA aus  $M9^-$ -Glutamat ein schwaches und bei der RNA aus der  $M9^+$ -Kultur kein Hybridisierungssignal sichtbar. Da jeweils gleiche RNA-Mengen auf das Gel aufgetragen wurden, bestätigt die unterschiedliche

Signalstärke die Regulation, die aufgrund von proteinchemischen Untersuchungen bereits vermutet wurde [Klöppner, 1999].

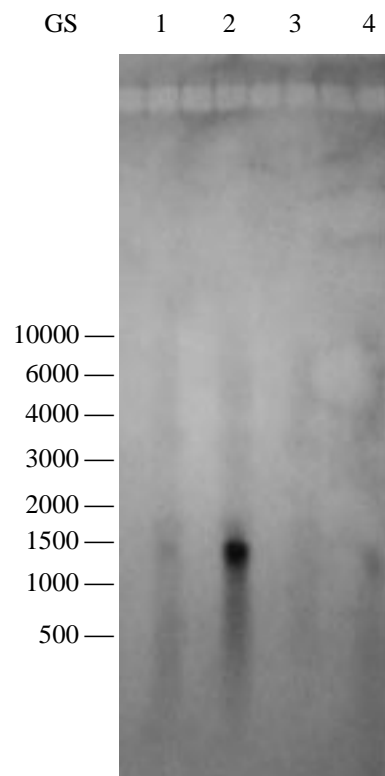


Abb. 4.9: Northernblot

Als Template wurden jeweils gleiche Mengen Gesamt-RNA aus *P. fluorescens* WT bzw. *P. putida* WT eingesetzt. Die mRNA-Sonde entsprach der „anti-sense“-mRNA des *P. fluorescens* WT *ansB*-Transkripts. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen bei 68 °C. GS = RNA-Längenstandard I (BM); 1 = *P. fluorescens*-RNA aus M9<sup>+</sup>-Kultur; 2 = *P. fluorescens*-RNA aus M9<sup>-</sup>-Glu-Kultur; 3 = *P. putida*-RNA aus M9<sup>+</sup>-Kultur; 4 = *P. putida*-RNA aus M9<sup>-</sup>-Glu-Kultur

#### 4.13 Nachweis der $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit des *ansB*-Gens

Die gefundenen -24 / -12-Sequenzen stimmen zwar mit bereits bekannten  $\sigma^{54}$ -Promotoren überein, dennoch sind sie kein eindeutiger Beweis für eine  $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit des Promotors. Um eine  $\sigma^{54}$ -Promotoraktivität zu bestätigen wurden Aktivitätstests mit einer RpoN (=  $\sigma^{54}$ )-defizienten Mutante des *P. putida*-Stammes KT2440 (*P. putida* KT2440rpoN) [Köhler *et al.*, 1989] durchgeführt. Als Vergleichsstämme dienten der Stamm *P. putida* KT2440 WT, *P. fluorescens* WT sowie der Biokontrollstamm *P. fluorescens* Pf 5. In beiden *P. fluorescens*-Stämmen wurde bereits eine PF-GA-Aktivität nachgewiesen. Bevor der Beweis mit der RpoN-defizienten Mutante durchgeführt werden konnte, mußte zunächst sichergestellt werden,

daß in dem Stamm *P. putida* KT2440 eine Glutaminase-Asparaginase-Aktivität vorliegt. Dazu wurde der Stamm in M9<sup>+</sup>- und M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium angezogen und ein Aktivitätstest mit AHA durchgeführt. Es wurde eine GA-Aktivität nachgewiesen. Dabei war die Aktivität im M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium induziert und im M9<sup>+</sup>-Medium nicht induziert. Die Regulation entsprach also der der anderen untersuchten *Pseudomonaden*. Die Stämme *P. fluorescens* WT, Pf 5, *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440rpoN wurden jeweils in M9<sup>+</sup>- und M9<sup>-</sup>-Medium angezogen und die Asparaginase-Aktivitäten in der exponentiellen Wachstumsphase mit AHA bestimmt. Dazu wurden jeweils mehrere Messungen in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Bei jeder Messung wurde gleichzeitig die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die erhaltenen relativen spezifischen Aktivitäten sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, wird die Asparaginase-Aktivität in *P. fluorescens* WT, Pf 5 und *P. putida* KT2440 durch Glutamat induziert und durch Ammoniumchlorid/Glucose nicht induziert. Die Aktivitätsunterschiede können auf die Unterschiedlichkeiten der Organismen zurückgeführt werden. Bei der Mutante *P. putida* KT2440rpoN ist die Regulation vollständig ausgeschaltet. Zusätzlich beweist das Experiment die Regulation der Pf-GA. Sie wird durch Glucose und Ammoniumchlorid nicht induziert und durch Glutamat als einziger C- und N-Quelle induziert.

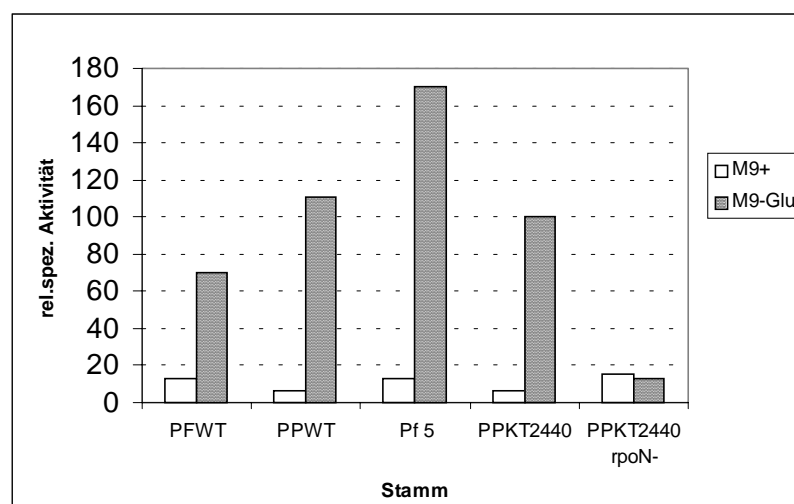


Abb. 4.10: relative spezifische GA-Aktivität verschiedener *Pseudomonas*-Stämme.

M9+ = M9-Minimalmedium (enthält 22,2 mM Glucose und 18 mM NH<sub>4</sub>Cl); M9-Glu = M9-Minimalmedium ohne Glucose, ohne NH<sub>4</sub>Cl aber mit 5 mM Glutamat; PF = *P. fluorescens*; PP = *P. putida*; rpoN- = rpoN-defiziente Mutante des *P. putida* KT2440-Stammes; Die spezifische Aktivität des *P. putida* KT2440 WT-Stammes in M9-Glu-Medium wurden auf 100 % gesetzt und alle anderen auf diesen Wert bezogen.

#### 4.14 Identifizierung weiterer Asparaginase-Gene in anderen *Pseudomonas*-Stämmen

Um festzustellen, ob auch eindeutig wachstumsfördernde Pseudomonaden (PGPB) das *ansB*-Gen besitzen, wurden mit verschiedenen wachstumsfördernden und pflanzenpathogenen *Pseudomonas*-Stämmen (vgl. Tabelle 4.5) eine PCR mit den Pf-GA-spezifischen Primern PSGA1 und PSGA2 durchgeführt.

Tabelle 4.5: *Pseudomonas* Stämme, mit denen die PCR durchgeführt wurde

wachstumsfördernde Stämme	pflanzenpathogene Stämme
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>P. syringae</i> pv glycinea (XV16) WT
<i>P. fluorescens</i> W24	<i>P. syringae</i> pv glycinea PG 4180N9
<i>P. fluorescens</i> W34	<i>P. syringae</i> pv tomato (DC 3000)
<i>P. fluorescens</i> (GSPB 230)	<i>P. syringae</i> syringae
<i>P. putida</i> II 232	
<i>P. chlororaphis</i> I 112	

Dazu wurde aus Übernachtskulturen genomische DNA präpariert und als Template in der PCR eingesetzt. Für die PCRs wurden zunächst die gleichen Bedingungen gewählt, wie für den *P. fluorescens* WT. Wenn dabei keine Amplifikate erhalten wurden, wurden die Hybridisierungstemperaturen herabgesetzt (48 °C; 54 °C anstelle von 53 °C; 58 °C).

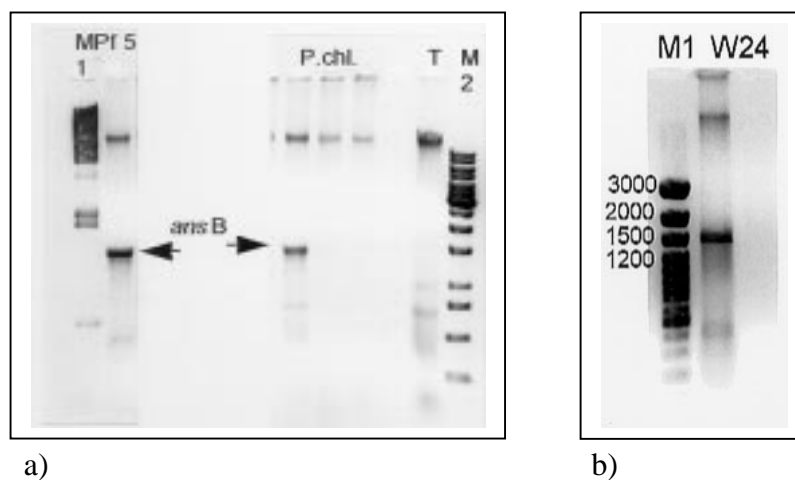


Abb.11 a, b: PCR mit wachstumsfördernden *Pseudomonas* Stämmen

- a) M1 =  $\lambda$ -Hind III-Marker; Pf5 = *P. fluorescens* Pf5; P.chl. = *P. chlororaphis*; T = Template-DNA;  
 M2 = 100 bp Leiter plus;  
 b) M1 = 100 bp Leiter plus; W24 = *P. fluorescens* W24



Außerdem wurden die Template- und  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentrationen variiert. Unter diesen Bedingungen zeigten nur die Stämme *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* W24 und *P. chlororaphis* eine Bande von ca. 1300 bp erhalten. In Abbildung 11 a und b sind die amplifizierten Banden dargestellt.

#### 4.15 Klonierung und Analyse eines *ansB*-Gens aus *P. fluorescens* Pf 5

Die bereits beschriebenen Untersuchungen wurden an einem *P. fluorescens*-Wildtyp-Stamm durchgeführt. Im Hinblick auf Besiedlungsstudien und Anwendbarkeit auf Kulturflächen außerhalb des Labors ist es sinnvoll zu untersuchen, ob die gefundenen Gene / Enzyme auch in sogenannten Biokontrollstämmen vorkommen.

Ein gut untersuchter Biokontrollstamm ist der von Corbell und Loper beschriebene *P. fluorescens*-Stamm Pf-5 [Corbell & Loper, 1995].

Da die Ähnlichkeit/Identität der Pf-GA und der PGA aus *Pseudomonas* sp. 7A sehr groß war, wurde vermutet, daß die Ähnlichkeit zwischen dem *P. fluorescens* WT und Pf 5 sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene ebenfalls hoch ist. Deshalb wurde mit den spezifischen *P. fluorescens-ansB*-Primern PSGA 1 und PSGA 2 und genomischer DNA aus Pf 5 als Template eine PCR durchgeführt. Wobei die gleichen Hybridisierungstemperaturen gewählt wurden wie bei *P. fluorescens* WT. Man erhielt ein ca. 1,3-1,4 kb großes DNA-Fragment, das in den Vektor pBluescript SK(+) kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid pB-Pf5-PGA wurde nach Restriktionsanalyse sequenziert. Die erhaltene DNA-Sequenz stimmt zu 82 % mit der *ansB*-Sequenz aus *P. fluorescens* WT überein und die von dieser Sequenz abgeleitete Proteinsequenz stimmt zu 90 % mit der Pf-GA überein. Ein Teil des Vergleichs dieser beiden Sequenzen auf Proteinebene ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

Auch diese Asparaginase besitzt ein Signalpeptid (s. Abb. 4.12). Um die Regulation, die aufgrund von proteinchemischen Untersuchungen von den gleichen Faktoren wie bei der Pf-GA abzuhängen scheint, zu bestätigen, wurde eine Northernblot-Analyse des Gens durchgeführt. Dazu wurden Pf 5-Zellen in  $M9^{+}$ - und  $M9^{-}$ -Glutamat-Medium angezogen und Gesamt-RNA isoliert. Nach Auftrennung auf einem denaturierenden Formaldehydgel und Transferierung auf eine Nylonmembran wurde mit der für die Pf-GA spezifischen T7-mRNA-Sonde hybridisiert.

Wie beim *P. fluorescens*-WT wurde mit der RNA, die aus der M9<sup>-</sup>-Kultur gewonnen wurde, ein, wenn auch schwaches, Signal erhalten. Mit der RNA aus dem M9<sup>+</sup>-Medium ergab sich kein Hybridisierungssignal (nicht gezeigt).

Pf5-GA	MKSALKTFFVPGALALLLLFPVAAQAKEVETKTKLANVVILATGGTIAGAGASAANSATYQA	61
Pf-GA	MKSAFKSFAPGALALLLLPAALQAKEAETQQKLSNVVVLATGGTIAGAGASAANSATYQA	
Pf5-GA	AKVGIEQLIAGVPELSQIANVRGEQVMQIASESINNENLLQLGRRVAELADSKDVGIVIT	122
Pf-GA	AKVGIEQLIAGIPELSQLANVRGERVMQIASESITNENLLQLGRRVAELADSKDVGIVIT	
Pf5-GA	HGTDLTLEETAYFLNLVEKTDKPIIVVGSMRPGTAMSADGMLNLYNAVAVAGSKDARGKGV	183
Pf-GA	HGTDLTLEETAYFLNLVEKTDKPIIVVGSMRPGTAMSADGMLNLYNAVAVAGSKNARGKGV	

Abb. 4.12: Aminosäuresequenzvergleich der Pf5-GA mit der Pf-GA (vorderer Teil)

Pf5-GA = Proteinsequenz der Asparaginase aus *P. fluorescens* Pf-5; Pf-GA = Proteinsequenz der GA des *P. fluorescens* WT; Die Signalpeptide sind grau unterlegt; die erste Aminosäure des reifen Proteins ist fett gedruckt

#### 4.16 Erzeugung von Mutanten durch Zufalls-Tn5-Mutagenese

Um einerseits die Pf-GA in *P. fluorescens* durch eine „Knock-out“-Mutation zu inaktivieren und andererseits weitere Enzyme zu identifizieren, die an der Verwertung von Asparagin, Aspartat, Glutamat und Glutamin beteiligt sind, wurde eine Zufalls-Transposon-Mutagenese durchgeführt. Als Transposonvektor diente das von dem Transposon Tn5-B21 [Simon *et al.*, 1989] abgeleitete Transposon Tn5-OT182 [Merriman & Lamont, 1993]. Die Konjugation wurde als „diparentales Mating“ mit *E. coli* S 17-1 (pOT182) (vgl. Abb. 3.4) als Donor und *P. fluorescens* WT als Rezipient durchgeführt. Zum Screenen nach Mutanten, die Defekte in einem Enzym hatten, das am Abbau der oben genannten Aminosäuren beteiligt ist, wurden die Mutanten nach Verlust des Donors auf verschiedene Minimalmedienplatten umgesetzt, die bestimmte Aminosäuren enthielten. Außerdem wurden gezielt Aktivitätstests durchgeführt.

#### 4.17 Suche nach Mutanten mit Defekten im Abbau der Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat

Die Suche nach Mutanten mit einem derartigen Defekt, erwies sich als schwierig. Da es sich bei allen gesuchten Enzymen um abbauende Enzyme handelte, war eine gezielte Selektion nicht möglich. Da *P. fluorescens* und *P. putida* die stickstoffhaltigen Aminosäuren Asn, Gln, Glu, Asp sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle nutzen können [Kloeppner, 1999] wurde zunächst nach Mutanten gesucht, die nicht mehr in der Lage sind, auf einer oder mehreren der genannten Aminosäuren als einziger C- und N-Quelle zu wachsen. Zur Selektion von Transkonjuganten wurden die Zellen nach der Konjugation zunächst auf M9<sup>+</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>-Platten ausplattiert. Nach Anlegen von „Masterplates“, wurden die Transkonjuganten mit einem Lederberg-Samt-Stempel auf M9<sup>-</sup>Cb<sup>300</sup>Tet<sup>50</sup>-Platten umgesetzt. Diese enthielten jeweils eine der Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin, und Glutamat in der Konzentration von 10 mM als einzige C- und N-Quelle. Nach Inkubation von 1-2 Tagen bei 30 °C wurde auf den Platten nach Mutanten gesucht, die nicht mehr wuchsen. Mit dieser Methode wurden jedoch keine Mutanten eindeutig identifiziert.

#### 4.18 Gezielte Selektion

Die zuvor durchgeführte Selektion war darauf ausgelegt, alle Transkonjuganten zu selektieren. Daher wurden bei jeder Konjugation sehr viele Mutanten erhalten. Die weitere Suche nach Mutanten, die auf einer der Aminosäuren Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin als einziger C- und N-Quelle nicht mehr wachsen konnten, beruhte auf der Wachstumsfähigkeit auf den entsprechenden Aminosäuren. Dabei war es teilweise schwierig zu erkennen, ob sich die einzelnen Kolonien auf den Platten vermehrten, oder ob lediglich Reste vom Umstempeln auf den Platten erschienen. Aufgrund der sehr großen Zahl an Transkonjuganten wären quantitative Tests sehr aufwendig und kostspielig gewesen. Deshalb wurden einige „Vorselektionen“ durchgeführt, bevor mit spezifischen Tests weitergearbeitet wurde. Da an der Verwertung dieser Aminosäuren viele Enzyme beteiligt sind, wurde die Selektion vielseitig angelegt, damit parallel nach verschiedenen Mutanten gesucht werden konnte. Zum Verständnis ist in Abbildung 4.13 ein Übersichtsschema der einzelnen Selektionen und Tests dargestellt.

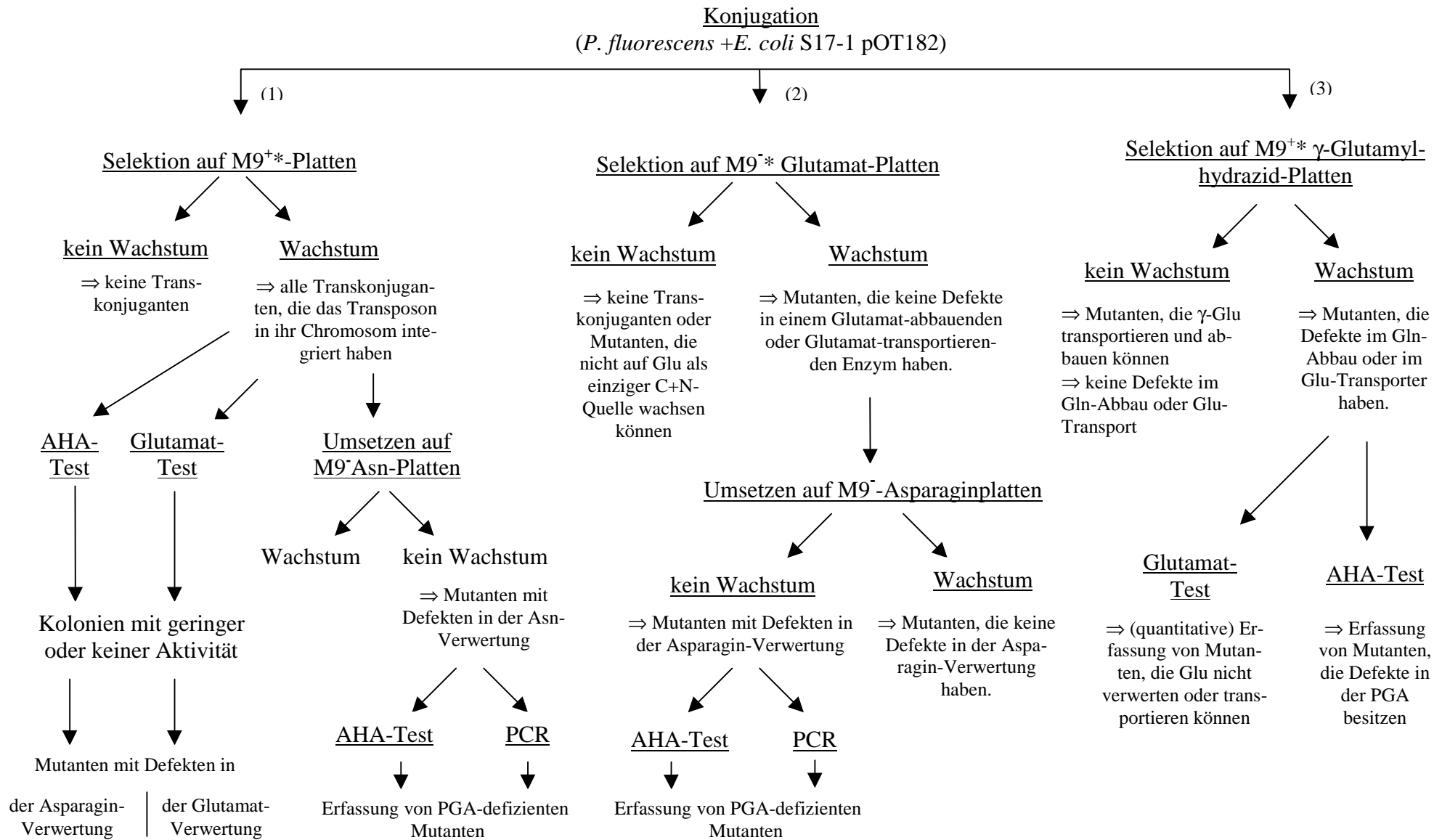


Abb. 4.13 Selektionsschema: M9<sup>-</sup> = M9 ohne NH<sub>4</sub>Cl/Glucose; M9<sup>+</sup> = M9 mit NH<sub>4</sub>Cl/Glucose; \* = Carbenicillin<sup>300</sup>Tetracyclin<sup>50</sup>; γ-Glu = γ-Glutamylhydrazid; Glu = Glutamat; Gln = Glutamin; Asn = Asparagin;

Zur Vereinfachung wurde im Schema und bei der Beschreibung der Ergebnisse folgende Abkürzungen und Bezeichnungen verwendet:  $M9^+$  (bzw. +) steht für  $M9^-$  Minimalmedium mit Glucose und Ammoniumchlorid als C- und N-Quelle.  $M9^-$  (bzw. -) bedeutet  $M9^-$  Minimalmedium ohne  $NH_4Cl$  und Glucose. Die Aminosäure, die als einzige C- und N-Quelle diente, wird im Anschluß an diese Bezeichnung angegeben. Das \* steht für die Antibiotika Carbenicillin und Tetrazyklin, die zur Selektion positiver Transkonjuganten in den Konzentrationen 300  $\mu g/ml$  und 50  $\mu g/ml$  ( $Cb^{300}Tet^{50}$ ) eingesetzt wurden.

Nach der Konjugation wurden die Zellen außer auf  $M9^{+*}$ -Platten (1) zusätzlich auf  $M9^-$  \*Glu- (2) und  $M9^{+*}\gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten (3) ausplattiert (vgl. Selektionsschema). Um sicherzustellen, daß die Donorbakterien (*E. coli* S17-1/pOT182) nicht mehr vorhanden waren, wurden die Zellen dreimal auf frische Selektionsplatten umgesetzt. Um die Kolonien später identifizieren zu können, wurden schon beim ersten Umsetzen „Masterplatten“ der Transkonjuganten erstellt. Auf den  $M9^{+*}$ -Platten sollten nur solche Mutanten wachsen, die das Transposon in ihr Chromosom integriert haben. Bakterien, die das Transposon nicht in ihr Chromosom integriert hatten, bzw. Donorbakterien sollten das mehrmalige Umsetzen auf frische Selektionsplatten nicht überleben, weil sie keine Resistenz gegen die Antibiotika (Cb, Tet) besitzen. Da diese Selektion nur auf positive Transkonjuganten ausgelegt war, wurden sehr viele Kolonien erhalten. Zur Identifizierung von relevanten Mutanten mit Defekten in der Glutamatverwertung, wurden quantitative Glutamat-Tests durchgeführt. Zur Identifizierung von Glutaminase-Asparaginase-defizienten Mutanten dienten zunächst AHA-Tests in Mikrotiterplatten. Da die Ergebnisse dieser Tests durch das teilweise sehr unterschiedliche Wachstum der Kolonien nicht gut vergleichbar waren, wurden die Kolonien zusätzlich auf  $M9^{+*}$ -Platten mit Asparagin (10 mM) als einziger C- und N-Quelle umgesetzt. Auf diese Weise wurden Kolonien selektiert, die Defekte in der Asparaginverwertung besaßen, also im Asparagin-Abbau oder Asparagin-Transport. Diese Mutanten wurden dann mit AHA-Tests und PCR mit PF-GA-spezifischen Primern auf GA-Defekte untersucht.

Mutanten, die in der Lage sind, auf  $M9^{+*}$ -Platten mit Glutamat als einziger C- und N-Quelle zu wachsen, sollten keinen Defekt in einem Glutamat-transportierenden oder Glutamat-abbauenden Enzym haben. Mutanten, die auf diesen Platten nicht wuchsen, hatten entweder das Transposon nicht in ihr Chromosom integriert und besaßen deshalb keine Resistenz gegen die beiden Antibiotika, oder sie waren nicht in der Lage Glutamat

als einzige C- und N-Quelle zu verwerten. Die auf den Glutamatplatten gewachsenen Mutanten wurden auf M9<sup>-</sup>-Asn-Platten umgesetzt. Da Asparagin dort die einzige C- und N-Quelle ist, sollten die Mutanten auf diesen Platten keine Defekte in der Asparaginase, in einem Asn-Transporter oder anderen Asn-abbauenden Enzym haben. Mutanten, die kein Wachstum auf dieser Aminosäure zeigten, sollten in einem der genannten Proteine einen Defekt haben. Durch AHA-Tests und PCRs mit PF-GA-spezifischen Primern wurden solche Mutanten auf PF-GA-Defekte untersucht.

Mutanten, die auf M9<sup>+</sup>- $\gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten (3) kein Wachstum zeigten, konnten  $\gamma$ -Glutamylhydrazid in die Zelle transportieren und abbauen. Durch Abbau dieses Glutamin-Analogons entsteht toxisches Hydrazin bzw. ein Hydraziniumion, welches zum Tod der Zelle führt. Transkonjuganten, die  $\gamma$ -Glutamylhydrazid entweder nicht transportieren oder abbauen konnten, sind jedoch in der Lage auf diesen Platten zu wachsen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß, wie in anderen Organismen auch, Glutamin und Glutamat von demselben Transportsystem in die Zelle gebracht werden. (vgl. Kapitel 5.4.2)

Die genaue Durchführung der einzelnen Selektionen und die erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

#### 4.19 Suche nach Mutanten mit Defekten in der Asparaginverwertung

Zunächst wurden die Bakterien nach der Konjugation in verschiedenen Verdünnungen auf M9<sup>+</sup>-Platten ausplattiert, um Bakterienzellen zu selektieren, die das Transposon in ihr Chromosom integriert hatten. Es wurden je nach Verdünnung zwischen 50 und 500-600 Mutanten pro Platte erhalten. Nachdem durch mehrmaliges Umsetzen auf M9<sup>+</sup>-Platten sichergestellt war, daß keine Donorbakterien mehr vorhanden waren, wurden zur Identifizierung von Mutanten verschiedene Tests durchgeführt. Begonnen wurde mit AHA-Tests der Mutanten in Mikrotiterplatten. Wie in Kapitel 3.32.2 beschrieben, wurden für diesen Test die einzelnen Kolonien in jeweils 100  $\mu$ l M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium in Mikrotiterplatten angezogen und das Wachstum durch OD<sub>600</sub>-Messung verfolgt. Sobald die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase waren, wurde der AHA-Test, wie in 3.32.2 beschrieben, durchgeführt. Da immer Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt wurden, ließ sich die Asparaginase-Aktivität sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt. In Abbildung 4.14 sind zwei typische Testplatten dargestellt. In

den ersten vier Wells der obersten Reihe (A1-A4) befinden sich die Leerwerte bzw. eine induzierte und eine nicht-induzierte *P. fluorescens*-WT Kultur. Eine gelbe oder hellgrüne Färbung zeigt keine bzw. eine geringe Asparaginase-Aktivität an. Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen, war in einigen Wells keine oder nur eine geringe Aktivität festzustellen. Allerdings zeigte die Überprüfung der OD<sub>600</sub>-Werte, daß viele Mutanten mit geringer Pf-GA-Aktivität, in den Mikrotiterplatten nicht oder nur schwach angewachsen waren.

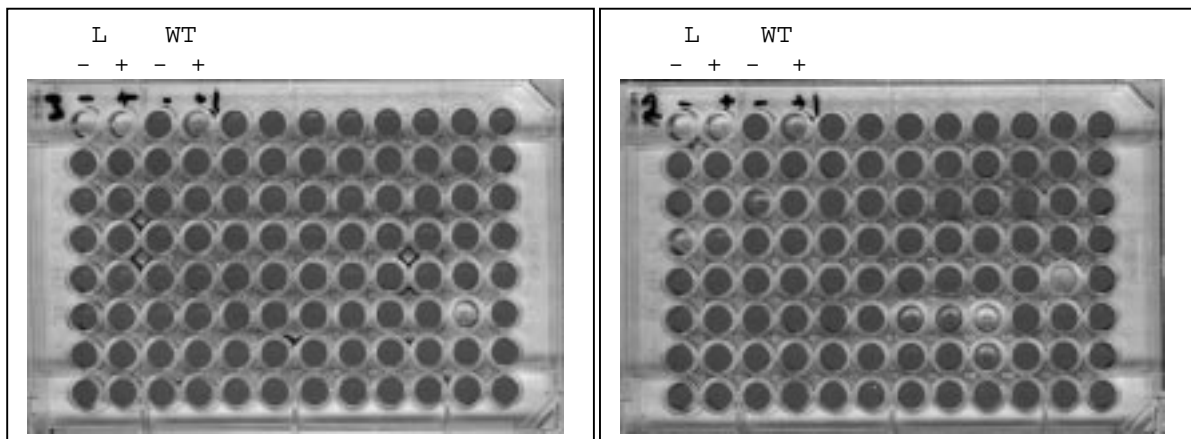


Abb. 4.14: Mikrotiter-AHA-Testplatten

L = Leerwert (reines Medium); WT = Wildtyp; + = M9-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl und Glucose; - = M9-Medium ohne NH<sub>4</sub>Cl, ohne Glucose aber mit 5 mM Glutamat (Die Markierungen auf den Platten haben keine Bedeutung; sie markieren nur die letzte Kolonie einer Agarplatte; WT + = Negativkontrolle (nicht-induziert); WT - = Positivkontrolle (induziert))

Ein Problem dieses Tests war, daß das Wachstum der einzelnen Kolonien in den Mikrotiterplatten teilweise sehr unterschiedlich war. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, daß bei Durchführung des Tests bereits einige Kulturen den Anfang der stationären Wachstumsphase erreicht hatten. Durch die in dieser Phase auftretenden toten Bakterienzellen konnten die Meßergebnisse durch freigesetzte cytosolische Asparaginase verfälscht werden. Die quantitative Erfassung der Aktivität (durch Absorptionsbestimmung bei 655 nm im ELISA-Reader) war durch die in der Lösung vorhandenen Zellen bzw. durch TCA ausgefällte Proteine ungenau bzw. nicht gut vergleichbar. Ein Abzentrifugieren der Testplatten und Transferieren des klaren Überstandes vor der Messung in eine neue Mikrotiterplatte war zwar möglich, erwies sich in der Praxis aber als sehr umständlich. Die scheinbar PF-GA-negativen oder nicht eindeutigen Mutanten, die durch diesen Test identifiziert wurden, untersuchte man durch PCR mit den spezifischen *P. fluorescens ansB*-Primern PSGA1 und PSGA2 auf

eine Insertion in dem *ansB*-Gen. Allerdings zeigten alle 63 getesteten Mutanten eine spezifische *ansB*-Bande, deren Größe der des Wildtyps entsprach.

Aufgrund der genannten Probleme bei dem Mikrotiter-AHA-Test wurden die Transkonjuganten zur weiteren Selektion auf M9<sup>-</sup>-Asparaginplatten umgestempelt. Dadurch sollte die große Zahl der Mutanten auf diejenigen eingeschränkt werden, die Defekte in der Asparaginase-Verwertung besaßen. Dies ermöglichte eine Durchführung des AHA-Tests bzw. die Anzucht der Bakterien in größeren Kulturen.

Zum Umsetzen wurden zunächst Mikrotiter-Glycerinstockplatten angelegt und die Mutanten von diesen Platten auf M9<sup>-</sup>-Asparaginplatten umgestempelt. Um ein zufälliges Nicht-Wachstum, z. B. durch Fehler beim Umstempeln, auszuschließen, wurden diese Mutanten mindestens zweimal auf frische Asparaginplatten umgesetzt. Durch Überprüfung der OD<sub>600</sub> bei der Herstellung der Stockplatten wurde sichergestellt, daß mangelndes Wachstum auf den Asparaginplatten nicht dadurch zustande kam, daß die Kolonien schon in den Stockplatten nicht anwuchsen.

Um die Anzahl der Transkonjuganten einzuschränken, die auf Asparaginplatten umgesetzt werden sollten, wurden die Bakterien nach der Konjugation statt auf M9<sup>+</sup>\*- auf M9<sup>-</sup>\*-Glutamat-Platten umgesetzt. Mutanten, die auf diesen Platten wuchsen, hatten offenbar keine Defekte in der Glutamatverwertung. Von diesen Mutanten wurden Glycerinstockplatten angelegt und die Kolonien auf M9<sup>-</sup>-Asparaginplatten umgesetzt. Mutanten, die auf diesen Platten nicht mehr anwuchsen, sollten also einen Defekt in der Asparaginverwertung haben. Insgesamt wurden durch die Selektionen (1) und (2) (s. Abb. 4.13) 15 Mutanten identifiziert, die nicht auf den Asparaginplatten wuchsen. Um festzustellen, ob diese Mutanten eine Insertion im *ansB*-Gen besaßen, wurde eine PCR mit den *ansB*-spezifischen Primern PSGA1 und PSGA2 durchgeführt.

Außerdem wurde die Pf-GA-Aktivität mit dem AHA-Test bestimmt. In Abb. 4.15 ist das Ergebnis der PCR von sieben Mutanten gezeigt.



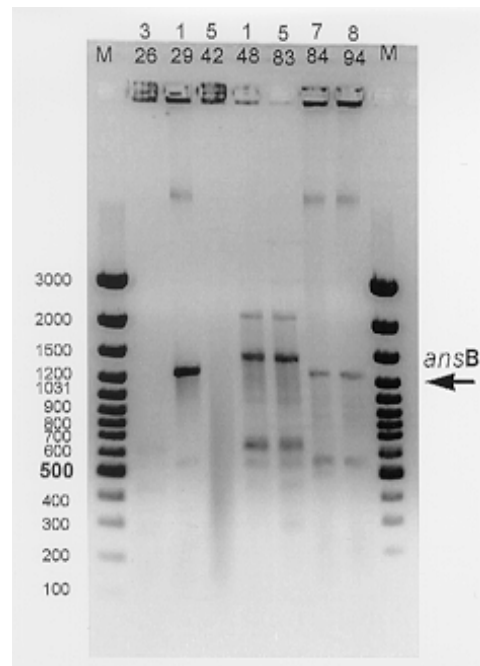


Abb.4.15: Ergebnis der PCR von sieben Mutanten

Die PCR wurde mit den Pf-GA-spezifischen Primern PSGA 1 und PSGA 2 und genomischer DNA der einzelnen Mutanten durchgeführt.

M = Marker (100 bp-Leiterplus (peqlab) in bp; Die Zahlen (2/26; 1/29; 5/42; 1/48; 5/83; 7/84; 8/94) geben die Platten bzw. Kolonie-Nummer an.

Wie man erkennt, ist bei den Mutanten 1/48 und 5/83 die *ansB*-Bande zu höheren Werten verschoben. Alle anderen, außer 3/26, zeigen eine *ansB*-Bande bei ca. 1300 bp, wie sie auch bei der PCR mit dem Wildtyp erhalten wurde. Das Fehlen einer Bande bei 3/26 kann auf typische PCR-Probleme zurückgeführt werden. Eine Wiederholung der PCR mit Zellen dieser Kolonien zeigte ebenfalls ein spezifisches *ansB*-Amplifikat bei 3/26. Die anderen acht Mutanten zeigten ebenfalls eine PCR-Bande, die der des Wildtyps entsprach.

Wie bereits erwähnt, wurde parallel zu der PCR ein AHA-Test mit den 15 Mutanten durchgeführt. Dazu wurden die Kolonien in 50 ml M9<sup>+</sup>-Medium über Nacht bei 30 °C angezogen. Mit dieser Übernachtskultur wurden dann jeweils 50 ml M9<sup>+</sup> und 50 ml M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 30 °C inkubiert. Stündlich wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und 100 µl für einen AHA-Test entnommen. Als Kontrolle wurde der *P. fluorescens* WT in beiden Medien angezogen, gleichfalls das Wachstum (OD<sub>600</sub>) bestimmt und ein AHA-Test durchgeführt. Dabei muß erwähnt werden, daß die Mutante 5/83 sowohl in M9<sup>+</sup>, M9<sup>-</sup>-Glu als auch LB-Medium nicht mehr angewachsen war. Deshalb konnte diese Mutante nicht mehr überprüft werden. Stellvertretend für die restlichen getesteten Mutanten sind die Wachstumskurven und spezifischen Aktivitäten

der Mutanten 5/25, 1/48 und 67 in den Abbildungen 4.17, 4.18, 4.20 und 4.21 dargestellt. Die Wachstumskurven des Wildtyps und die aus den AHA-Tests erhaltenen spezifischen Aktivitäten sind in den Abbildungen 4.16 und 4.19 dargestellt.

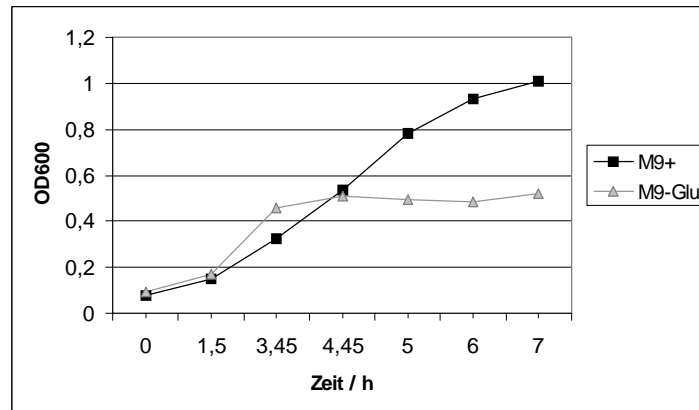


Abb. 4.16: Wachstumskurven des *P. fluorescens* WT in M9<sup>+</sup> und M9<sup>-</sup>-Glutamat

M9+ = M9-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl und Glucose. M9-Glu = M9-Medium ohne Glucose und NH<sub>4</sub>Cl aber mit 5 mM Glutamat

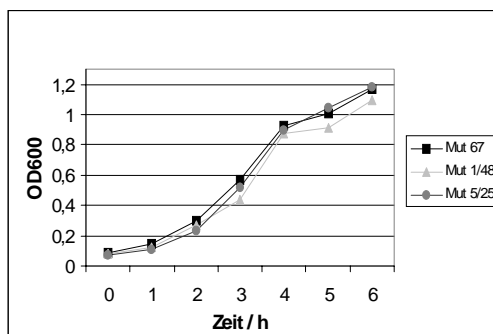


Abb. 4.17

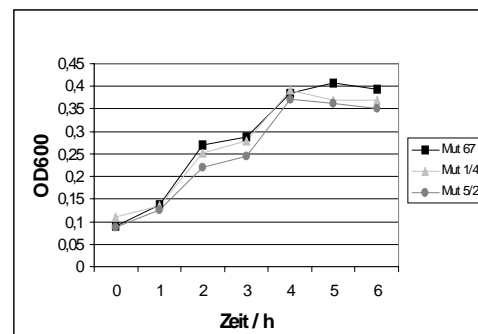


Abb. 4.18

Abb. 4.17 ,4.18: Wachstumskurven der Mutanten 5/25, 1/48 und 67 in den Medien M9<sup>+</sup> und M9<sup>-</sup>-Glutamat (5 mM)

M9+ = M9-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl und Glucose. M9-Glu = M9-Medium ohne Glucose und NH<sub>4</sub>Cl aber mit 5 mM Glutamat

Man erkennt, daß sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten in den beiden Medien gleichartig wachsen, wobei das Wachstum in dem M9<sup>-</sup>-Medium mit Glutamat als einziger C- und N-Quelle insgesamt geringer war. Das kann aber daran liegen, daß mit Glutamatkonzentrationen von 5 mM den Zellen nur relativ wenig Nährstoffe zur Verfügung stand und sie deshalb schneller die stationäre Phase erreichten.

In den Abbildungen 4.19, 4.20 und 4.21 sind die relativen spezifischen Pf-GA-Aktivitäten der Mutanten und des Wildtyps in verschiedenen Medien in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Dabei beziehen sich die Zeitangaben auf Stunden nachdem die

Kulturen aus der Übernachtskultur angeimpft wurden. Betrachtet man die relativen spezifischen Aktivitäten des *P. fluorescens* WT, so stellt man fest, daß im  $M9^+$ -Medium, also in Medium mit Glucose und Ammoniumchlorid als C- und N-Quelle, die PF-GA-Aktivität gleichbleibend niedrig war. Sie wurde weder induziert noch reprimiert. In  $M9^-$ -Glutamat-Medium - d. h. in  $M9$ -Minimalmedium, mit Glutamat als einziger C- und N-Quelle - war die PF-PGA Aktivität ca. 3-4 x höher als in  $M9^+$ -Medium. Dabei fällt auf, daß die Aktivität kurz nach dem Animpfen aus der  $M9^+$ -Übernachtskultur am größten war. Danach fiel die PF-GA-Aktivität leicht ab und bleibt dann relativ konstant. In der  $M9^+$ -Kultur beobachtet man die gleiche Tendenz. Zunächst ist die Aktivität am größten, dann fällt sie leicht ab. Der leichte Anstieg der Aktivität bei 5 h und 6 h kann dadurch erklärt werden, daß die Zellen sich zu dem Zeitpunkt schon in der stationären Phase befinden. Durch die in dieser Wachstumsphase absterbenden Zellen wurde die cytosolische Asparaginase-Glutaminase freigesetzt, deren Aktivität dann bei dem AHA-Test mit erfaßt wurde.

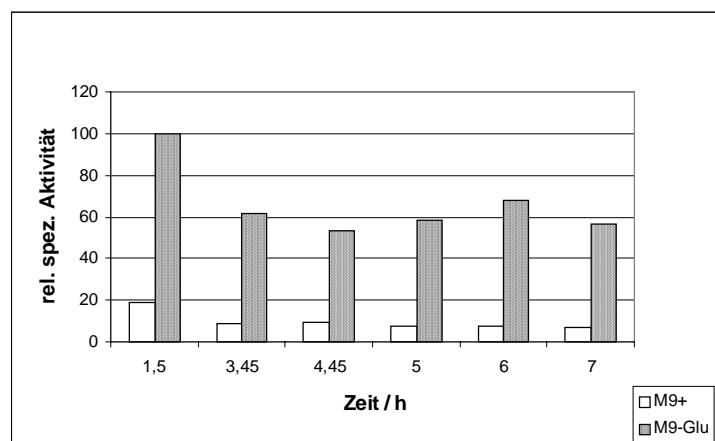


Abb. 4.19: Relative spezifische Pf-GA-Aktivität von *P. fluorescens* WT in  $M9^+$  und  $M9^-$ -Glutamat;

$M9^+$  =  $M9$ -Medium mit  $NH_4Cl$  und Glucose.  $M9-Glu$  =  $M9$ -Medium ohne Glucose und  $NH_4Cl$  aber mit 10 mM Glutamat; Zeit / h = Zeit nach Animpfen in Stunden; Als Bezugspunkt diente die Aktivität bei 1,5 h in  $M9-Glu$ ;

Bei den Mutanten verhielten sich die relativen spezifischen Aktivitäten entsprechend. In  $M9^+$ -Medium war die Aktivität ca. 2-3 x geringer als in  $M9^-$ -Glutamat-Medium.

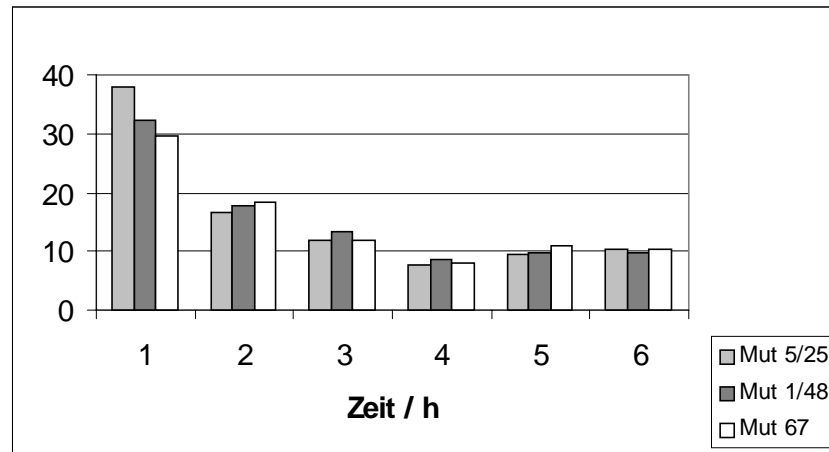


Abb. 4.20: Relative spezifische Pf-GA-Aktivität der Mutanten 5/25, 1/48 und 67 in M9<sup>+</sup>-Medium

M9<sup>+</sup> = M9-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl und Glucose. M9-Glu = M9-Medium ohne Glucose und NH<sub>4</sub>Cl aber mit 5 mM Glutamat; Mut = Mutante; die spez. Aktivitäten sind auf die spezifische Aktivität des WT in M9-Glu Medium bezogen;

Zunächst war die Aktivität in M9<sup>+</sup> etwas erhöht, pendelte sich dann aber auf Werte um 10 % ein. Ein Vergleich mit dem Wildtyp zeigt, daß in M9<sup>+</sup>-Medium der erste Wert des WT kleiner ist als bei Mutanten.

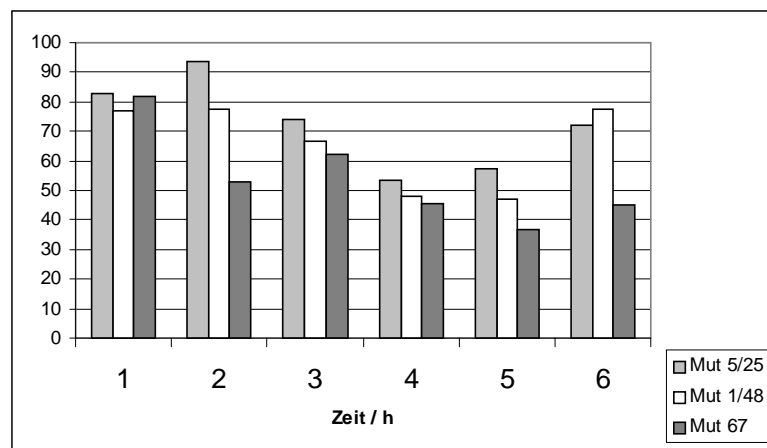


Abb. 4.21: Relative spezifische Pf-GA-Aktivität der Mutanten 5/25, 1/48 und 67 in M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium (c (Glu) = 5 mM);

M9<sup>+</sup> = M9-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl und Glucose. M9-Glu = M9-Medium ohne Glucose und NH<sub>4</sub>Cl aber mit 5 mM Glutamat; Mut = Mutante; die spez. Aktivitäten sind auf die spezifische Aktivität des WT in M9-Glu Medium bezogen;

In M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium war die PF-PGA der Mutanten wie beim WT induziert. Analog zum WT stieg hier die PF-GA-Aktivität in der ersten Zeit nach dem Animpfen an, bevor sie ein wenig absank. Der Anstieg nach vier Stunden kann wiederum durch das Erreichen der stationären Wachstumsphase und der dadurch freigesetzten cytosolischen Asparaginase-Glutaminase erklärt werden.

In Abbildung 4.22 sind die relativen spezifischen Aktivitäten der Mutanten und des Wildtyps M9<sup>+</sup>- und M9<sup>-</sup>-Glutamat noch einmal übersichtlich dargestellt. Man erkennt bei allen eine Induktion in M9<sup>-</sup>-Glutamat und eine relativ niedrige Aktivität in Glucose/Ammoniumchlorid-Medium. Die Mutanten zeigten also eine dem Wildtyp entsprechende Regulation und Aktivität der PF-PGA. Die Unterschiede in den Absolutwerten können auf unterschiedliche Zelldichten, während der Messungen zurückgeführt werden.

Die restlichen 12 Mutanten zeigten vergleichbare Wachstumskurven und relative spezifische Aktivitäten (nicht gezeigt). Die untersuchten Mutanten hatten also entgegen den zuerst gemachten Beobachtungen keine Defekte in der PF-PGA.

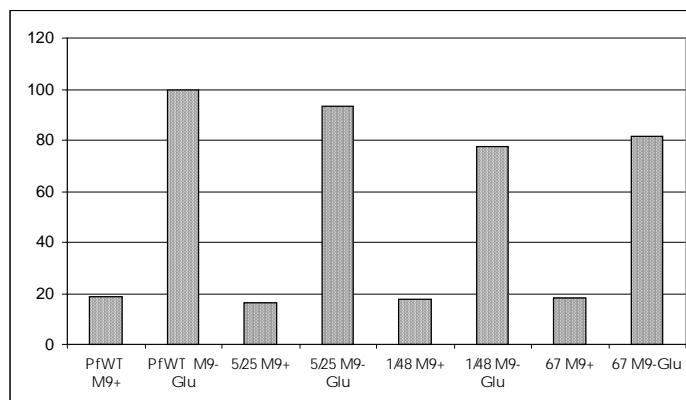


Abb. 4.22: Vergleich der relativen spezifischen Pf-GA-Aktivitäten des *P. fluorescens* WT und der Mutanten in M9<sup>+</sup> und M9<sup>-</sup>-Glutamat-Medium

M9+ = M9-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl und Glucose. M9-Glu = M9-Medium ohne Glucose und NH<sub>4</sub>Cl aber mit 5 mM Glutamat; PfWT = *P. fluorescens* WT; die spez. Aktivitäten sind auf die spezifische Aktivität des WT in M9-Glu Medium bezogen;

Zur Kontrolle wurden die Mutanten noch einmal in M9<sup>-</sup>-Asparagin-Flüssigmedien angezogen und AHA-Tests durchgeführt. Obwohl alle Mutanten auf den M9<sup>-</sup>-

Asparaginplatten nicht angewachsen waren, wuchsen sie in den Flüssigmedien an. Die gemessenen relativen spezifischen Aktivitäten sind in Abbildung 4.23 zusammengefaßt. Wie die Abbildung 4.23 zeigt, ist die Pf-PGA auch in  $M9^-$ -Asparagin-Medium aktiv, wenn auch geringer als in  $M9^-$ -Glutamat.

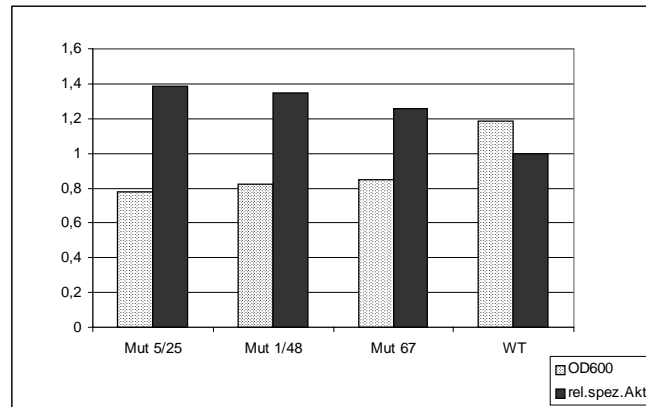


Abb. 4.23: Relative spezifische Aktivität der Mutanten und des *P. fluorescens* WT in  $M9^-$ -Asparagin-Medium;  $c(\text{Asn}) = 10 \text{ mM}$

OD600 = optische Dichte bei 600 nm; Mut = Mutante; WT = Wildtyp; die spez. Aktivitäten sind auf die spezifische Aktivität des WT in  $M9$ -Asn-Medium bezogen

Um die Anzahl möglicher Mutanten mit Defekten in der Asparagin-Glutaminverwertung weiter einzuschränken, wurden die Mutanten nach der Konjugation auf  $M9^+ \gamma$ -Glutamylhydrazid-Platten ( $\gamma$ -Glu-Platten) ausplattiert.  $\gamma$ -Glutamylhydrazid ist ein toxisches Substratanaloges des Glutamins. Wenn es in die Zelle gelangt und abgebaut wird, entstehen Hydraziniumionen, die toxisch für die Zelle sind. Auf diesen Platten sollten also nur Transkonjuganten wachsen, die Defekte im Glutamin-Abbau besitzen. Da die Pf-PGA sowohl Glutamin als auch Asparagin umsetzt, sollten durch diese Selektion Mutanten mit Defekten in der Pf-PGA oder anderen Asn / Gln abbauenden Enzymen selektiert werden.

Da in vielen Bakterien mindestens ein Transportprotein für den Transport von Glu, Gln, Asn und Asp existiert, war zu erwarten, daß Mutanten mit einem Defekt in einem dieser Transporter auch auf diesen Platten wachsen können, sofern der Defekt nicht durch einen zweiten Transporter ausgeglichen wird.

Auf diesen Platten wuchsen meist nur sehr wenige Mutanten. Diese wurden mit Hilfe des AHA-Tests auf Defekte in der PF-PGA untersucht. Allerdings konnten auch bei dieser Selektion keine PF-GA-negativen Mutanten identifiziert werden.

## 4.20 Suche nach Mutanten mit Defekten in der Glutamatverwertung

Um Mutanten zu identifizieren, die Defekte in der Glutamatverwertung, also im Transport und Abbau, besaßen, wurden mit den Mutanten, die auf den M9<sup>+</sup>\*- und M9<sup>+</sup>\*γ-Glu-Platten wuchsen, Glutamat-Tests durchgeführt. Dazu wurden die Transkonjuganten in M9-Minimalmedium angezogen, das kein Ammoniumchlorid dafür aber 1 mM Glucose und 0,8 mM Glutamat enthielt. Die Glucose sollte das Anwachsen aller Mutanten ermöglichen, auch derjenigen die kein Glutamat verwerten konnten. Das Wachstum der Zellen wurde durch OD<sub>600</sub>-Bestimmung überprüft und noch vorhandenes Glutamat mit der Glutamat-Dehydrogenase (GIDH), Diaphorase und Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT) bestimmt (vgl.3.32.3). Da in diesem Fall nicht abgebautes Glutamat quantitativ erfaßt wurde, ermöglichte dieser Test auch die Bestimmung von Mutanten, deren Glutamatverwertung nur eingeschränkt war.

Allerdings konnte bei diesen Versuchen noch keine Mutante eindeutig identifiziert werden, die Glutamat nicht verwerten konnte.

## 5 Diskussion

Biokontroll-Bakterien beeinflussen auf verschiedene Art und Weise das Pflanzenwachstum positiv. Um ihre pflanzenfördernden Eigenschaften im Boden ausüben zu können, müssen sie in der Lage sein, das Wurzelsystem effektiv zu besiedeln. Dabei ist unter anderem der Wettbewerb um Nährstoffe von Bedeutung. Nur Bakterien, die die vorhandenen Nährstoffe verwenden können, haben Vorteile bei der Besiedelung der Wurzel. Da die Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat mit 40 - 50 % [Barber & Gunn, 1974] einen Großteil der Aminosäuren in den Wurzelexsudaten vieler Nutzpflanzen (Getreide, Gemüse) ausmachen, stellt sich die Frage, ob die Bakterien durch die effiziente Verwertung der Aminosäuren einen Besiedelungsvorteil erhalten. Dazu muß zunächst der Stoffwechsel dieser Aminosäuren charakterisiert werden. Bei der Untersuchung des Stoffwechsels von Glutamin/Glutamat und Asparagin/Aspartat schien es sinnvoll, zunächst ein gut bekanntes bakterielles Enzym zu klonieren und genauer zu charakterisieren. Deshalb wurde in dieser Arbeit aus dem *P. fluorescens* Wildtyp-Stamm ATCC 13525, der als Modellorganismus gewählt wurde, zuerst eine Glutaminase-Asparaginase kloniert und deren Regulation untersucht. Anschließend wurde versucht, weitere Enzyme zu identifizieren, die an der Verwertung der oben genannten Aminosäuren beteiligt sind.

### 5.1 Klonierung einer Glutaminase-Asparaginase aus *P. fluorescens* WT

Asparaginasen und Glutaminasen gehören zur Enzymklasse der Amidohydrolasen. In vielen Fällen kann jedoch nicht eindeutig zwischen einer Asparaginase- und Glutaminase-Aktivität unterschieden werden, da viele dieser Enzyme sowohl Asparagin als auch Glutamin als Substrate nutzen. Solche Enzyme werden deshalb als Glutaminasen-Asparaginasen bezeichnet. Asparaginasen und Glutaminasen wurden bereits in vielen Gram-negativen und einigen Gram-positiven Bakterien sowie in einigen Hefen- und Pflanzenspezies identifiziert. Weil die Asparaginase II aus *E. coli* als Tumorthapeutikum bei akuter Lymphatischer Leukämie (ALL), einer Art des Blutkrebses, eingesetzt wird, zählt dieses *E. coli*-Enzym zu den am besten untersuchten Asparaginasen. In *E. coli* gibt es zwei Asparaginasen, die sowohl kloniert als auch



charakterisiert worden sind [Jennings *et al.*, 1990 und 1993]. Aufgrund dieser Ergebnisse können die Asparaginasen bzw. Glutaminasen-Asparaginasen in 2 Klassen (Typ I und Typ II) eingeteilt werden. Die Typ I-Asparaginase in *E. coli* (AnsA) ist im Cytosol lokalisiert, besitzt eine geringe Substrataffinität und wird konstitutiv exprimiert. Die Asparaginasen (bzw. Glutaminasen-Asparaginasen) des Typs II sind im Periplasma lokalisiert, besitzen eine hohe Substrataffinität und ihre Expression wird reguliert. Im Gegensatz zu den Asparaginasen des Typs I, die ausschließlich Asparagin umsetzen, besitzen die Typ II-Enzyme eine breitere Substratspezifität. Sie setzen häufig außer L-Asparagin auch L-Glutamin und teilweise die D-Isomere dieser Aminosäuren um. Die beiden Klassen der Asparaginasen unterscheiden sich aber nicht nur in den Eigenschaften, sondern auch in der DNA- und Aminosäuresequenz [Jennings & Beacham, 1990]. Der Vergleich des aus dem *P. fluorescens* WT klonierten Gens und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz mit anderen Glutaminase-Asparaginase-Sequenzen zeigte große Übereinstimmungen mit verschiedenen Glutaminasen-Asparaginasen vom Typ II.

Tabelle 5.1: Eigenschaften der Glutaminasen-Asparaginasen

Enzym	Organismus	SwissProt/ Trembl	Lokali- sierung	M (kDa)	UE	Glutaminase- aktivität (%)
Asparaginase II	<i>E. coli</i>	ASG2_ECOLI	Peripl.	138,4	4	1
Asparaginase	<i>W. succinogenes</i>	ASPG_WOLSU	Cytopl.	139,5	4	<1
Asparaginase	<i>E. chrysanthemi</i>	ASPG_ERWCH	Peripl.	140,2	4	90
Glutaminase- Asparaginase	<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>	ASPQ_ACIGL	?	141,9	4	100
Glutaminase- Asparaginase	<i>Pseudomonas sp. 7A</i>	ASPQ_PSES7	?	144,8	4	140
Glutaminase- Asparaginase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	O68897	Peripl.	144,7	4	140

SwissProt/Trembl = Datenbank-Accession-Nr.; UE = Untereinheiten; M = Gewicht in Kilodalton;

Die größte Übereinstimmung besteht mit der PGA aus dem nicht näher charakterisierten Bakterium *Pseudomonas sp. 7A* [Lubkowski *et al.*, 1994]. Die hohe Übereinstimmung von 88 % auf Proteinebene ist wegen der Verwandtschaft der beiden Organismen nicht überraschend. Auch auf DNA-Ebene ist die Homologie ausgeprägt, wobei berücksichtigt werden muß, daß die DNA-Sequenz der PGA aus *Pseudomonas sp. 7A* von der

durch Aminosäuresequenzierung erhaltenen Proteinsequenz abgeleitet worden ist. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes sind natürlich Abweichungen möglich. Die gefundene Signalsequenz (vgl. Abb. 4.3) bzw. die Identität der ersten zehn Aminosäuren des reifen Proteins mit einer Glutaminase-Asparaginase, die aus einem periplasmatischen Überstand desselben *P. fluorescens* WT-Stammes nativ gereinigt wurde, bestätigten die periplasmatische Lokalisation des Proteins. Aufgrund der Tatsache, daß dieses Enzym Glutamin schneller umsetzt als Asparagin [Klöppner, 1999; Hüser *et al.*, 1999] und in Analogie zu der von Roberts [Roberts, 1976] isolierten PGA aus *Pseudomonas sp.* 7A wurde das *P. fluorescens* Enzym mit Pf-GA, für *P. fluorescens* Glutaminase-Asparaginase, bezeichnet. Das klonierte Gen wurde, in Anlehnung an die *E. coli*-Bezeichnung, *ansB* genannt. Wie das Alignment in Abbildung 4.2 zeigt, stimmt die Sequenz der Pf-GA auch mit weiteren L-Asparaginasen des Typs II gut überein. Alle Reste, die eine katalytische Funktion besitzen sind auch in der Pf-GA konserviert (vgl. Abb. 5.1).

Enzym	Teilsequenzen							
					114 ↓	248 ↓		
EcAnsB	TGGTI	YTVG	IGSQD	ITHGTDI	VGAMRP	GNGNLYK	DAEVDD	
WA	TGGTI	YSAG	IGSQE	ITHGTDI	VGSMPR	GNGNPFP	DAEVDD	
ErA	TGGTI	YKAG	MASEN	ITHGTDI	VAAMRP	GAGSVSV	DEELPG	
AGA	TGGTI	YSAA	VASES	ITHGTDI	VGSMPR	GNGSMAN	NAEQPD	
PGA	TGGTI	YQAA	IASSES	ITHGTDI	VGSMPR	GNGSVSS	NAEQPD	
PfGA	TGGTI	YQAA	IASSES	ITHGTDI	VGSMPR	GNGSVSS	NAEQPD	
kat. Reste	↑ 12	↑ 25	↑ 58	↑↑ 89 90			↑ 283	

Abbildung 5.1: Alignment der katalytischen Reste

EcAnsB = *E. coli*-Asparaginase II; WA = Asparaginase aus *W. succinogenes*; ErA = *E. chrysanthemi*-Asparaginase; AGA = *A. glutamiasificans*-Asparaginase; PGA = *Pseudomonas sp.* 7A-GA; Pf-GA = *P. fluorescens*-Glutaminase-Asparaginase; die Nummerierung bezieht sich auf das *E. coli*-Enzym

Einige weitere Aminosäuren, die vor allem an der Substratbindung beteiligt sind, stimmen zwar nicht überein, scheinen aber dennoch die Aktivität der Pf-GA nicht negativ zu beeinflussen. Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 5.2 das aktive Zentrum der *E. coli*-Asparaginase II dargestellt. So ist z. B. in AnsB aus *E. coli* der Rest Ala-114, zusammen mit Ser-58, Asp-90 und Glu-283, durch Bildung von Wasserstoffbrücken, an der Substratbindung beteiligt. In der Pf-PGA, der PGA aus

*Pseudomonas sp.* 7A und der Asparaginase aus *A. glutaminasificans* ist dieser Rest gegen Serin ausgetauscht. In den Asparaginasen aus *S. cerevisiae* und den beiden Gram-positiven Organismen *B. subtilis* und *B. licheniformis* (im Alignment nicht gezeigt) befindet sich an dieser Stelle ein Serinrest. Außer in AnsB befindet sich nur noch in den Asparaginasen aus *W. succinogenes* und *E. chrysanthemi* an dieser Stelle ein Alaninrest. Aufgrund der Tatsache, daß nur die Carbonylgruppe des Alaninrestes-114 an der Substratbindung beteiligt ist, sollte ein Serinrest an dieser Stelle keine negativen Auswirkungen auf die Katalyse haben. Ebenfalls nicht konserviert ist Asn-248, dem aufgrund der Untersuchungen an AnsB eine Beteiligung bei der Substratbindung zugeordnet wurde [Wehner *et al.*, 1994]. Bei *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* 7A, *E. chrysanthemi* und *A. glutaminasificans* befindet sich an dieser Position Serin. Nur die Enzyme aus *E. coli* und *W. succinogenes* enthalten an dieser Position 248 einen Asparaginrest. Da sowohl Asparagin als auch Serin hydrophil und polar sind, sind keine Auswirkungen auf die Substratbindung zu erwarten. Allerdings beeinflußt Asparagin-248 in der *E. coli* Asparaginase II zusammen mit Gln-59 selektiv die Substratspezifität [Wehner *et al.*, 1994]. Auffallend ist jedoch, daß alle Enzyme mit einem Serinrest in Position 248 eine hohe Glutaminase-Aktivität zeigen (vgl. Abb. 5.1).

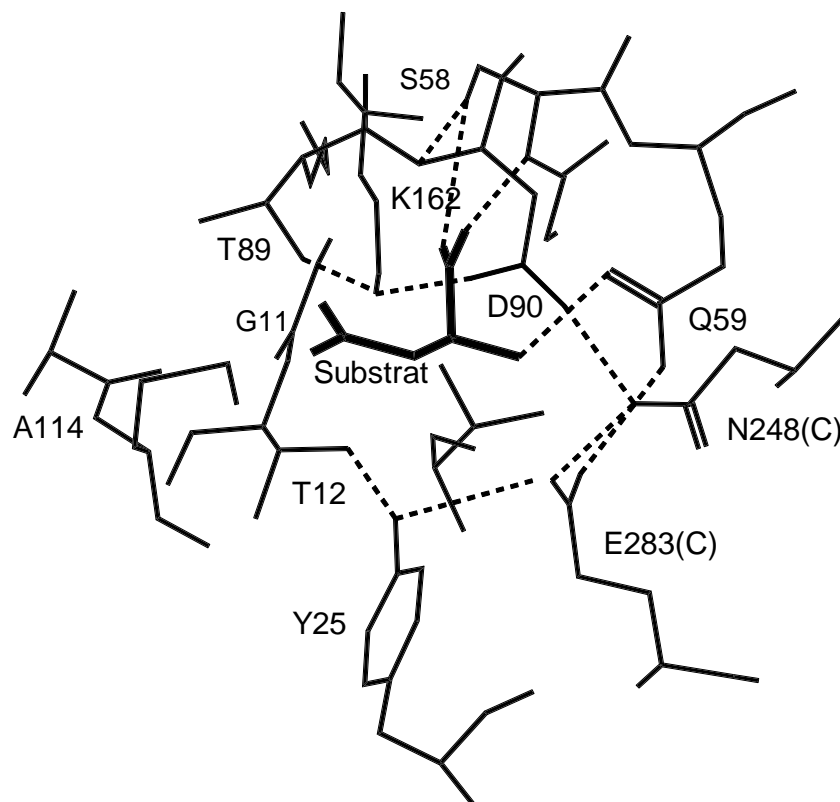


Abbildung 5.2: Aktives Zentrum der *E. coli* Asparaginase II

Durch die Reinigung und Bestimmung der Substratspezifität der rekombinanten Pf-GA-His<sub>8</sub> wurde die Zugehörigkeit der Pf-GA zur Klasse der Typ II-Asparaginasen bestätigt (vgl. Tab. 5.1). Sowohl das Gewicht, als auch die Substratspezifität (Umsatz von L-Asn, L-Gln und sogar D-Asn) stimmten mit dem nativ gereinigten Enzym aus periplasmatischen Überständen überein [Klöppner, 1999]. Daß L-Glutamin schneller von der Pf-GA umgesetzt wird als L-Asparagin, entspricht der häufig in den Pseudomonaden gefundenen doppelten Substratspezifität der *Pseudomonas* Glutaminasen-Asparaginasen [Imada *et al.*, 1973]. Die breitere Substratspezifität der periplasmatischen Enzyme ermöglicht es den Bakterien, mit einem Enzym zwei Aminosäuren aufzunehmen bzw. verfügbar zu machen. Für die cytosolische Asparaginase wäre eine hohe Glutaminase-Aktivität katastrophal, da Glutamin ein wichtiger NH<sub>2</sub>-Donor in der Zelle ist. Deshalb setzen z. B. Die Typ II-Enzyme aus *E. coli* und *Pseudomonas*, die im Periplasma lokalisiert sind, sowohl Glutamin als auch Asparagin um, während die cytosolische Asparaginase vom Typ II aus *W. succinogenes* sehr spezifisch für Asparagin ist. Interessant hierbei ist außerdem, daß sich die cytosolischen und periplasmatischen Enzyme in der Struktur der aktiven kaum Zentren unterscheiden. Wodurch die unterschiedliche Substratspezifität im Periplasma und im Cytosol vermittelt wird, ist bis jetzt nicht geklärt.

## 5.2 Regulation der Pf-GA

### 5.2.1 $\sigma^{54}$ -abhängige Promotoren

Nachdem der Transkriptionsstartpunkt identifiziert worden war, wurde in dem stromaufwärts liegenden DNA-Bereich nach einem Promotor für die Anlagerung der RNA-Polymerase gesucht. Obwohl die Consensus-Sequenzen für den am häufigsten in Prokaryoten vorkommenden RNA-Polymerase-Sigmafaktor ( $\sigma^{70}$ ) in unterschiedlichen Genen und Organismen geringfügig variiert, so liegen sie immer um die Basen -35 und -10. Eine Überprüfung dieses Bereichs ergab jedoch keine Übereinstimmungen mit bekannten  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotoren. Dagegen wurden bei den Basen -24 und -12 die invarianten GG- und GC-Motive von  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren gefunden [Thöny

*et al.*, 1989]. Auch die Abstände zwischen diesen beiden Bereichen und dem Transkriptionsstartpunkt zeigten signifikante Übereinstimmungen (vgl. Abb. 4.9) [Fischer *et al.*, 1994; Beynon *et al.*, 1983; Thöny *et al.*, 1989].

$\sigma^{54}$ -Promotoren wurden zuerst bei einem Glutamin-Synthetase-Gen in *Salmonella thyphimurium* [Garcia *et al.*, 1977] und bei *nif*-Genen in *Klebsiella pneumoniae* [Beynon *et al.*, 1983; Ausubel *et al.*, 1984; Alvarez-Morales *et al.*, 1985] identifiziert. Die  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren treten zwar nicht so häufig auf wie die  $\sigma^{70}$ -abhängigen, dennoch wurden sie mittlerweile bei vielen Genen in den unterschiedlichsten Prokaryoten identifiziert. Dabei sind sie nicht nur, wie zunächst vermutet, ausschließlich an der Expression von Stickstoff-regulierenden Genen beteiligt. Einige Beispiele für Gene, die unter der Kontrolle von  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren stehen, sind: Glutamin-Synthetase-Gen, Urease-Gen und Flagellin-Gen in *P. aeruginosa* [Härtig *et al.*, 1998], des *xylAB* Operon und *xylS* in *P. putida* [Inouye *et al.*, 1984], das Carboxypeptidase G2-Gen in *P. putida* [Kustu *et al.*, 1989], das Glutamin-Synthetase-Gen in *E. coli* und *S. thyphimurium* [Kustu *et al.*, 1989], sowie *ntrA* und *nifHDK* in *K. pneumonia* [Helmann & Chamberlin, 1988].

### 5.2.2 Regulation von $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren durch Aktivatorproteine

Interessant ist, daß alle bis jetzt bekannten  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren einer positiven Kontrolle durch Regulatorproteine unterliegen. Denn im Gegensatz zu  $\sigma^{70}$ -abhängigen RNA-Polymerasen ist das  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase-Holoenzym nicht in der Lage nach Anlagerung und Bildung eines stabilen geschlossenen Promotorkomplexes die Transkription zu initiieren. Erst durch die Anlagerung eines transkriptionellen Aktivators (Regulators) erfolgt in Anwesenheit von ATP die Umwandlung in einen offenen Promotorkomplex, der die Transkription ermöglicht.

In vielen Fällen binden die Aktivatorproteine nicht direkt an die  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase, sondern zunächst an spezifische Erkennungsstellen, die häufig 100 - 200 bp stromaufwärts, in einigen Fällen aber auch 1 kb vom Transkriptionsstartpunkt entfernt sein können [Kustu *et al.*, 1989]. Die Interaktion des an diese konservierten Regionen gebundenen Aktivatorproteins mit dem an der Consensus-Sequenz (-24/-12) gebundenen  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase-Holoenzym erfordert eine Schleifenbildung der

dazwischenliegenden DNA-Bereiche [Fischer *et al.*, 1994; Thöny *et al.*, 1989]. Dieser Prozeß kann entweder durch die Anlagerung des Aktivators an die RNA-Polymerase direkt erfolgen oder durch das DNA-Bindeprotein IHF („integration host factor“) unterstützt werden [Fischer *et al.*, 1994; Shingler *et al.*, 1996] (vgl. Abbildung 5.3). Die Aktivität der positiven Regulatorproteine selbst wird durch Signale aus der Umgebung beeinflußt. Dabei können die Regulatorproteine entweder direkt oder indirekt mit der

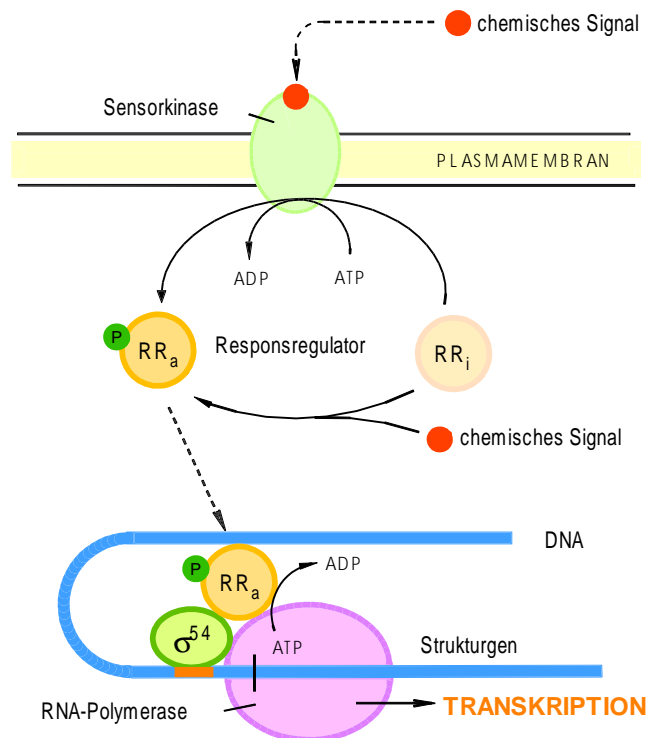


Abbildung 5.3: Regulation der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkription durch Aktivatorproteine  
 $RR_a$  = aktiviertes Aktivatorprotein;  $RR_i$  = inaktives Aktivatorprotein

DNA in Wechselwirkung treten [Shingler, 1996; Thöny *et al.*, 1989]. Voraussetzung für die direkte Wechselwirkung ist, daß die Regulatorproteine im Cytosol produziert oder frei zugänglich sind. Ein Vorteil dieser Art von Regulation ist eine schnelle direkte Antwort auf ein Induktionssignal aus der Umgebung. Die indirekte Wechselwirkung besteht aus einem Phosphorylierungs-Signal-Transduktions-System [Steiger, 1996]. Diese Aktivierung erfolgt zwar nicht direkt, ermöglicht aber eine Kommunikation zwischen extrazellulären Signalen und intrazellulärer transkriptioneller Antwort. Bei der indirekten Aktivierung sind die Regulator (Aktivator)-Proteine sogenannte „Antwort-Proteine“ für bestimmte Zwei-Komponenten-Regulationssysteme. Diese Systeme

enthalten eine „Sensor-Histidin-Kinase“, die meistens, aber nicht immer, membrangebunden ist. Diese Kinase erkennt ein spezifisches Signal aus der Umgebung und aktiviert sofort durch Phosphorylierung das Aktivatorprotein, das sich dann an die DNA binden und dem RNA-Polymerase-Holoenzym die Transkription ermöglichen kann. Diese Art der Aktivierung tritt z. B. bei dem *nif*-Regulatorprotein NtrC auf, das aufgrund des Stickstoffgehaltes der Zelle reguliert wird [Fischer *et al.*, 1994]. Bei der direkten Aktivierung wird das Aktivatorprotein durch bestimmte Substrate und / oder Intermediate des katabolischen Stoffwechselweges aktiviert, den sie regulieren. Beispiele hierfür sind XylR und PhlR in *Pseudomonas*, die den Abbau von bestimmten aromatischen Komponenten kontrollieren [Abril *et al.*, 1988; Shingler & Morr, 1994]. Die beschriebene Regulation von  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

```

AACGACAGGGCATCTGCCCCACCGTCAAACACGCCTGCATGAATATTCATCATGGTTTT
                                -127          -111
                                ***          ***
CGGACAACCGAACGCAATAGCCCCCTCACTGTTTCGGAAAGCCGGACAAACGCCCTCAGCC
                                -70          -58
                                ***          ***
CCACCTGCAAAAACCAATATAAGTTGTTTAAATCAACACGTTAATTTATATGTTTCGGCC
                                -24          -12          ↓TSSstart
ACCATCAGCCTGGTACAAATCCTGCTCTTTCTCAGCACCTCGCGGCATTCAGAATCGCCC
                                RBS          ↓TLStart
GGGTGTTCTAGATGAACCTGCTACCGCACTCATCAAAAACCAGAGAGAAAAATAATGAAA
G  C  S  R  *  T  C  Y  R  T  H  Q  K  P  E  R  K  I  M  K
TCTGCACTGAAAACTTCGTTCCGGGCGCCCTAGCCCTACTGCTGCTGTTCCCCGTTGCT
S  A  L  K  T  F  V  P  G  A  L  A  L  L  L  L  F  P  V  A
                                Signalpeptid
GCCCAGGCAAAGGAAGTCGAAACCAAGACCAAGCTGGCCAACGTGGTGATTCTCGCCACC
A  Q  A  K  E  V  E  T  K  T  K  L  A  N  V  V  I  L  A  T

```

Abbildung 5.4: Promotorbereich des *P. fluorescens ansB*-Gens

Die \*\*\* kennzeichnen mögliche Aktivator-Bindungssequenzen; -24 / -12 = Consensus-Sequenzen; RBS = Ribosomen-Bindungsstelle; TSSstart = Transkriptionsstartpunkt; TLStart = Translationsstartpunkt; das Startcodon ist fett gedruckt; das Signalpeptid der Pf-GA ist unterstrichen.

Wie bereits erwähnt wurde, besitzen einige der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren mehr als 100 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart Aktivatorsequenzen (TGT N<sub>6-10</sub> ACA),

die ebenfalls stark konserviert sind [Thöny *et al.* 1989; Buck *et al.*, 1986]. An diese Aktivatorsequenzen binden Regulatorproteine, die für die Aktivierung der Expression notwendig sind [Thöny *et al.*, 1989]. Bei Base -127 (TGT) und -111 (ACA), sowie bei -58 (ACA) und -70 (TGT) scheinen auch im Promotor des *P. fluorescens-ansB*-Gens solche Aktivator-Bindungs-Sequenzen zu liegen (vgl. Abb. 5.4). Dabei entspricht die Anzahl der Basen zwischen -127 und -111 nur ungefähr der geforderten Anzahl von 6 bis 10 Basen, während der Abstand zwischen -70 und -58 mit dem in bestimmten *nif*-Promotoren übereinstimmt [Buck *et al.*, 1986]. Um festzustellen, ob es sich bei den im *ansB*-Gen gefundenen Sequenzen tatsächlich um Aktivator-Bindungssequenzen handelt, müßte die Funktion dieser Bereiche erst durch Deletionsmutagenese untersucht werden.

Wie die Aktivierung in *P. fluorescens* erfolgt, ist noch unklar. Prinzipiell sind beide Möglichkeiten vorstellbar, denn Glutamat kann sowohl ins Cytosol transportiert werden, als auch im Periplasma eine Signaltransduktion auslösen.

### 5.2.3 $\sigma^{54}$ -abhängige Expression des *ansB*-Gens in *P. fluorescens*

Um die  $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit des *ansB*-Promotors zu bestätigen, wurde die spezifische Glutaminase-Asparaginase-Aktivität einer RpoN-defizienten Mutante des *Pseudomonas*-Stammes *P. putida* KT2440 (*P. putida* KT2440*rpoN*) [Köhler *et al.*, 1989] mit der des *P. fluorescens*-Wildtyps verglichen. Die RpoN-defiziente Mutante *P. putida* KT2440*rpoN* wurde bereits zur Identifizierung einer Reihe von Genen verwendet, deren Expression von dem  $\sigma^{54}$ -Faktor (RpoN) abhängt. Die identifizierten Gene vermittelten unter anderem den Metabolismus von Nitrat, Harnstoff und ungeladenen Aminosäuren (Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Serin) als N-Quellen, sowie C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten (Succinat, Fumarat) und  $\alpha$ -Ketoglutarat als C-Quellen [Köhler *et al.*, 1989]. Sowohl der *P. fluorescens* Wildtyp-Stamm, sowie die Stämme *P. fluorescens* Pf-5, *P. putida* WT und *P. putida* KT2440 WT zeigten eine Induktion durch Glutamat und eine Repression bzw. keine Induktion durch Ammoniumchlorid und Glucose. Das vollständige Ausbleiben dieser Effekte bei der RpoN-defizienten *P. putida*-Mutante zeigt, daß die periplasmatische Glutaminase-Asparaginase in diesem Stamm  $\sigma^{54}$ -abhängig ist (vgl. Abb. 4.11). Obwohl dies noch kein eindeutiger Beweis dafür ist, daß die Glutaminase-Asparaginase auch in den anderen Stämmen von  $\sigma^{54}$  abhängt, so legt doch die nahe



Verwandtschaft der Organismen - sie gehören alle zu den fluoreszierenden Pseudomonaden und der RNA-Homologie-Gruppe I - die Vermutung nahe, daß auch bei ihnen die Regulation dieses Enzyms  $\sigma^{54}$ -abhängig ist.

#### 5.2.4 Regulation anderer Asparaginasegene

In nicht sehr nah verwandten Organismen ist die Regulation der Asparinasen sehr unterschiedlich. So wird, wie bereits erwähnt, die Transkription des *ansB*-Gens in *E. coli* durch das cAMP-Rezeptor-Protein (CRP) und durch das Produkt des *fnr*-Gens, das FNR-Protein, positiv reguliert [Jennings & Beacham, 1990 und 1993; Jerlström *et al.*, 1987]. Durch diese Regulatorproteine kann *E. coli* die Expression von *ansB* in Abhängigkeit von Kohlenstoffquellen, vor allem Glucose, und vom Sauerstoffgehalt in der Umgebung regulieren. Dabei erfolgt die positive Regulation gleichzeitig durch CRP und FNR [Jennings & Beacham, 1990 und 1993]. Der Grund für die Induktion dieser Asparaginase unter Anaerobiose in *E. coli* ist, daß unter sauerstoff-limitierenden Bedingungen der Stoffwechselweg der Fumarat-Atmung beschriftet wird. Da Fumarat unter anderem aus Aspartat gebildet wird, ist für eine ausreichende Fumarat-Versorgung die Bildung von Aspartat aus Asparagin notwendig. In dem im Boden lebenden Bakterium *B. subtilis* ist dagegen die Synthese der Asparaginase AnsA (Typ I) nicht von CRP und FNR abhängig. Das Operon, das außer der Asparaginase (AnsA) auch noch eine Aspartase (AnsB) codiert, wird durch Aspartat induziert und durch Ammoniumionen reprimiert [Sun & Setlow, 1993].

Wie die proteinchemischen Untersuchungen und die Northernblot-Analyse zeigte, liegt in der Pf-GA eine vollständig andere Regulation als in den bis jetzt bekannten Glutaminasen-Asparinasen vor. Das Enzym wird offenbar nicht durch seine Substrate (Gln und Asn), sondern durch die Produkte Glutamat und Aspartat induziert. Eine Induktion durch Substrate ist sinnvoll, wenn Asparagin oder Glutamin als einzige C- und N-Quelle vorliegen. Durch die Induktion der Pf-GA sind die Zellen dann in der Lage diese Aminosäuren als Nahrungsquellen zu nutzen und so zu überleben. Im Gegensatz dazu ist die Induktion der Pf-GA durch Glutamat bzw. Aspartat als einziger C- und N-Quelle nicht leicht zu verstehen.

In *B. subtilis* liegt das Gen für eine Asparaginase (*ansA*) zusammen mit einem Aspartase-Gen (*ansB*) in einem Operon. Dieses Operon wird sowohl durch Asparagin als auch Aspartat als einziger C- und N-Quelle induziert bzw. transkribiert [Sun & Setlow, 1993]. Da dabei immer beide Enzyme exprimiert werden, ist diese Art der Regulation sinnvoll, wenn auch nicht unbedingt aus energetischer Sicht. Denn eins der beiden Enzyme kann auf jeden Fall das Substrat umsetzen. Eine mögliche Erklärung für die Induktion der Pf-GA durch die Produkte Glutamat und Aspartat wäre, daß durch Glutamat nicht nur die Pf-GA, sondern auch weitere Enzyme induziert werden. Eine 2D-Gel-Analyse zeigte, daß in *P. fluorescens* durch Glutamat außer der Pf-GA noch weitere Proteine induziert werden, die bei Wachstum auf Glucose / Ammoniumchlorid-Medium nicht vorkommen [Klöppner, 1999]. Glutamat und Aspartat könnten also ein globales Regulationssystem in *P. fluorescens* anschalten, durch das koordiniert mehrere Proteine induziert werden. Solche globalen Regulationssysteme, wurden bereits in den phytopathogenen Pseudomonaden *P. syringae* und *P. viridiflava* sowie in dem Biokontrollstamm *P. fluorescens* Pf-5 identifiziert [Corbell *et al.*, 1995]. In Pf-5 wird z. B. durch ein klassisches Zwei-Komponenten-Regulationssystem die Produktion verschiedener Antibiotika (Pyoluteorin, Pyrrolinitrin, 2,4-Diacetylphloroglucinol), HCN, extrazelluläre Proteasen und eine Tryptophan-Seitenketten-Oxidase reguliert. Die Systeme in den beiden phytopathogenen Stämmen besitzen zwar Ähnlichkeit mit dem System in Pf-5, nur ist dort das Regulationssystem an der Pathogenese der Pseudomonaden beteiligt [Corbell *et al.*, 1995]. Durch welche Verbindungen diese Regulationssysteme, die immer auch eine Sensorkinase-Komponente enthalten, angeschaltet werden, ist bis jetzt nicht bekannt. Deshalb kann auch nicht gesagt werden, ob Glutamat im *P. fluorescens* WT ein entsprechendes Regulationssystem induziert. Eine weitere mögliche Erklärung ist allerdings an die Voraussetzung gebunden, daß Glutamat und Aspartat immer zusammen mit Glutamin und Asparagin von den Wurzeln exsudiert werden. Unter solchen Bedingungen würde eine Induktion der Pf-GA durch Glutamat und Aspartat gleichzeitig die Verwertung von Asparagin und Glutamin ermöglichen.

### 5.3 Die Glutaminase-Asparaginase des Biokontroll-Stammes *P. fluorescens* Pf-5

Hinweise für die Beteiligung der Pf-GA an der Biokontrolle waren die durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen mit „Template-DNA“ aus verschiedenen phytopathogenen und pflanzenfördernden *Pseudomonaden*. Mit den Stämmen *P. fluorescens* Pf-5, W24 und *P. chlororapsis* wurden PCR-Amplifikate erhalten, die der Größe des *P. fluorescens* Wildtyp-Fragments entsprachen (vgl. Abb. 4.11). Bei den phytopathogenen Stämmen wurden keine entsprechenden PCR-Amplifikate erhalten (vgl. 4.14). In Übereinstimmung damit steht, daß in diesen Stämmen auch keine Pf-GA-Aktivität nachweisbar ist [Klöppner, 1999]. Ein Vergleich der DNA und der daraus abgeleiteten Proteinsequenzen des aus *P. fluorescens* Pf-5 klonierten PCR-Fragments ergab hohe Übereinstimmung mit der Pf-GA-Sequenz. Die großen Übereinstimmungen sind wegen der Verwandtschaft der beiden Organismen nicht überraschend. Durch die Klonierung des *ansB*-Gens aus Pf-5 wurde das Vorhandensein der Pf-GA auch auf molekularer Ebene bestätigt. Allerdings muß beachtet werden, daß die PCRs mit *P. fluorescens*-spezifischen Primern (PSGA1, PSGA2) durchgeführt wurden. Hinzu kommt, daß die beiden Primer nicht innerhalb des Gens, sondern vor dem Start- und hinter dem Stopcodon hybridisierten. Selbst wenn die DNA-Sequenzen innerhalb der *ansB*-Gene ähnlich sein oder übereinstimmen würden, so ist die Wahrscheinlichkeit relativ gering, daß die DNA-Sequenzen auch außerhalb der Gene übereinstimmen. Außerdem findet man häufig größere Übereinstimmungen auf Protein- als auf DNA-Ebene. Dennoch zeigen die Ergebnisse, daß Glutaminasen-Asparaginasen in vielen *Pseudomonas*-Arten vorkommen.

### 5.4 Transposon-Mutagenese zur Identifizierung weiterer am Aminosäurestoffwechsel beteiligter Enzyme

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch Transposon-Mutagenese Mutanten zu suchen, die einen Defekt in der Pf-GA oder in einem anderen am Stoffwechsel der Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat beteiligten Protein besitzen. Durch die Untersuchung solcher Mutanten sollten dann außer Enzymen, die die Aminosäuren verwerten, auch wichtige Regulatorproteine und Regulationsfaktoren

identifiziert werden. Für die Mutagenese wurde eine Zufalls-Transposon-Mutagenese mit einem Tn5-Element gewählt.

Transposon-Elemente sind eigenständige DNA-Elemente, die die Fähigkeit besitzen, sich an neue Stellen innerhalb des Genoms ihrer Wirtsorganismen zu bewegen. Dieser Transpositionsprozeß ist unabhängig von den klassischen homologen Rekombinations-system (*rec*) des Organismus. Die Insertion eines Transposon-Elements setzt keine Homologie zwischen den Enden des Elements und der Zielstelle voraus. Transposon-Elemente wurden in einer Vielzahl prokaryotischer und eukaryotischer Zellen gefunden, die sich in ihrem Aufbau und Merkmalen unterscheiden. Sie verursachen Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Amplifikationen und Translokationen, und können zur Einführung spezieller Gene in das Genom eines Ziel-Bakteriums genutzt werden. Durch die Tatsache, daß sich die Transposon-Elemente ohne die Rekombinationsmechanismen der Zelle in das Genom ihrer Wirtszellen integrieren können, bietet die Transposon-Mutagenese auch eine Möglichkeit zur genetischen Manipulation von anderen Bakterien als *E. coli*. Vor allem bei Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Pflanzenwurzeln wurden durch Transposon-Mutagenese viele wichtige Ergebnisse gewonnen. So konnte z. B. die Reaktion eines *P. fluorescens* Stammes auf Kohlenstoff-limitierenden Bedingungen im Boden untersucht werden [van Overbeek *et al.*, 1997]. Auch für Besiedelungsstudien wurde die Transposon-Mutagenese eingesetzt. Dabei wurden die zu untersuchenden Bakterien durch verschiedene „Nicht-Antibiotika“-Kassetten, z. B. *lacZ* oder GFP, markiert, so daß sie leicht identifiziert werden konnten [Fedi *et al.*, 1996; Burlage *et al.*, 1996].

#### 5.4.1 Das Transposon Tn5-OT182

Tn5 ist das am häufigsten eingesetzte Transposon-Element zur Untersuchung von Gram-negativen „Nicht-*E. coli*“ Spezies. Der Grund dafür sind die Vorteile, die Tn5 gegenüber anderen Transposons besitzt. Dazu gehören die hohe Übertragungsfrequenz in das Genom einer Vielzahl von Bakterienspezies, die unspezifische Insertion, sowie die geringe Wahrscheinlichkeit für Genom-Wiederherstellung durch Transposition. Außerdem bleibt das Transposon nach seinem Einbau in das Wirtsgenom sehr stabil erhalten [Simon *et al.*, 1989]. Bis jetzt wurden die unterschiedlichsten Tn5-Elemente (Transposon-Vektoren) für die Untersuchung von Bakterien-Pflanzen-Wechsel-

wirkungen eingesetzt [Fedi *et al.*, 1996; van Overbeek *et al.*, 1997; van Elsas *et al.*, 1991]. Dabei enthielten die Tn-Elemente häufig Reportergene, durch die die Regulation der Gene, die mutagenisiert wurden, direkt untersucht werden konnte.

Ein solches System ist das Transposon Tn5-OT182. Es ist von Tn5-B21 [Simon *et al.*, 1989] abgeleitet und wurde unter anderem zur Untersuchung von Pyoverdinsiderophor-Synthesegenen in *P. aeruginosa* verwendet [Merriman & Lamont, 1993]. Das Plasmid pOT182 (vgl. Abb. 3.4) das das Tn5-OT182 trägt, ist ein „Selbstklonierungs-Vektor“ mit einer breiten Wirtsspezifität. Außer dem ColE1-Replikationsursprung, der die Klonierung von DNA direkt neben dem Tn erlaubt, enthält es noch ein promotorloses *lacZ*-Reportergen, das die Untersuchung der Transkription der Gene ermöglicht, in die das Tn5-Element inseriert wurde. Zur Selektion von positiven Transkonjuganten trägt es Gene, die Resistenz gegen Tetrazyklin und  $\beta$ -Lactame codieren.

#### 5.4.2 Selektionsstrategien

Um Mutanten zu identifizieren, die Defekte an der Verwertung der oben genannten Aminosäuren besaßen, wurden die Transkonjuganten nach Verlust des Donors von M9<sup>+</sup>-Platten auf M9<sup>-</sup>-Minimalplatten umgesetzt, die anstelle von Glucose und Ammoniumchlorid eine der Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat sowie Succinat als einzige C- und N-Quelle enthielten. Succinat wurde als Nährstoff gewählt, weil es ein wichtiges Intermediat des Zitratzyklus ist. Auf den einzelnen Platten sollten nur Mutanten wachsen, die keine Defekte in der Verwertung der jeweiligen Aminosäure hatten. Zum Umstempeln wurde ein Samtstempel nach Lederberg verwendet. Dadurch entstand zum einen das Problem, daß nicht so viele Mutanten pro Platte umgestempelt werden konnten wie gewünscht, da sonst eine Trennung der umgesetzten Bakterien schwierig war. Das größte Problem dieser Selektion war aber sicherlich, daß immer noch nicht-wachsenden Mutanten gesucht werden mußte. Auf diese Weise stand kein eindeutiges Merkmal zur Verfügung, nach dem man suchen konnte. Ein weiterer Nachteil dieser Selektion ist, daß es mehr als ein Enzym für die Verwertung der einzelnen Aminosäuren geben kann. In diesem Fall kann ein Defekt in einem dieser Enzyme durch andere kompensiert werden. Deshalb wurde die Selektion teilweise etwas spezifischer gestaltet und zusätzlich noch Tests zur

Identifizierung von Mutanten durchgeführt (vgl. Abb. 4.13). Dabei waren spezifische Tests nur für die Untersuchung der Pf-GA-Aktivität (AHA-Test) und für Mutanten mit Defekten in der Glutamatverwertung (Glutamat-Test) möglich. Allerdings blieb auch hier das Problem bestehen, daß nichts darüber bekannt ist, wieviele Enzyme an der Verwertung der einzelnen Aminosäuren beteiligt sind.

Der erste Teil der Selektion (Abb. 4.13 (1)) war zunächst nur auf die Suche von positiven Transkonjuganten angelegt. Diese wurden dann mit weiteren Tests auf Defekte in der Pf-GA (AHA-Test) und Glutamatverwertung (Glutamat-Test) untersucht. Aufgrund der sehr großen Zahl an Transkonjuganten, die bei dieser Selektion anfielen, wurde der AHA-Test in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das teilweise extrem unterschiedliche Wachstum der Kolonien, die Meßergebnisse verfälschte. Außerdem bestand die Gefahr, daß durch absterbende und lysierende Zellen die cytosolische Asparaginase freigesetzt und deren Aktivität zusätzlich gemessen wurde. Für den Glutamat-Test waren solche Probleme nicht zu erwarten, da durch die Messung nur der Gesamtverbrauch an vorgegebenen Glutamat bestimmt wurde. Auch bei diesem Test können Defekte in einem Enzym, das durch ein zweites ausgeglichen wird, nur dann festgestellt werden, wenn das zweite Enzym eine wesentlich geringere Umsatzrate besitzt.

Zur weiteren Selektion wurden die Transkonjuganten auf Asparagin als einzige C- und N-Quelle umgesetzt. Mutanten, die auf diesen Platten nicht wachsen, sollten einen Defekt in der Asparaginverwertung besitzen. Um festzustellen, ob der Defekt in der Pf-GA lag, wurden AHA-Tests und PCRs durchgeführt.

Aufgrund der sehr großen Zahl der Mutanten, die getestet werden mußten und durch die Probleme bei dem AHA-Test in den Mikrotiterplatten, wurde die Selektion weiter eingeschränkt. Dazu wurden die Zellen nach der Konjugation auf Glutamat als einzige C- und N-Quelle umgesetzt (vgl. Abb. 4.13 (2)). Die Mutanten, die auf diesen Platten wuchsen, sollten keine Defekte in der Glutamatverwertung (Abbau und Transport) besitzen (vgl. Abb. 5.5). Auch hierbei tritt wieder das Problem auf, daß ein Defekt in einem dieser Enzyme nicht bemerkt wird wenn die Zellen mehr als ein Glutamat-verwertendes Enzym haben. Auch diese Zellen wurden auf Asparagin als einzige C- und N-Quelle umgesetzt. (vgl. Abb. 5.6).

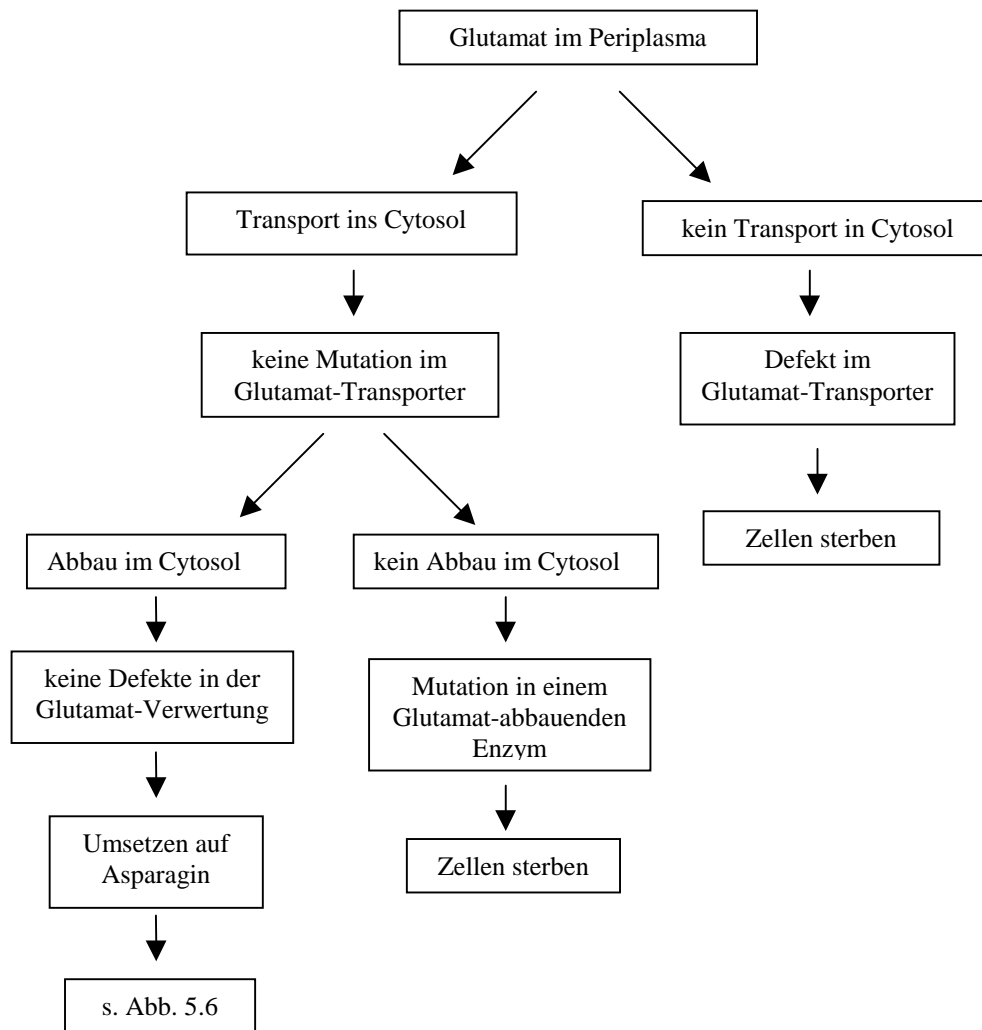


Abb. 5.5: Selektionsstrategie für die Suche nach Transposon-Mutanten

Mutanten, die hier nicht wuchsen, wurden durch AHA-Tests und PCRs auf Defekte in der Pf-GA untersucht. Obwohl einige Kolonien auf den Asparaginplatten nicht wuchsen, zeigten sie normale AHA-Aktivitäten und eine spezifische *ansB*-Bande. Der Grund dafür ist nicht ganz klar. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß zwar die Pf-GA intakt ist, aber ein Transporter Defekte aufweist, der sowohl Asparagin als auch Aspartat transportiert. Eine andere Möglichkeit wäre, daß das Aspartat in der Zelle nicht weiter umgesetzt werden kann. Da es keine geeignete Möglichkeit gab, die Asparagin- und Aspartat-Aufnahme der Zellen genau zu bestimmen, konnten die Mutanten nicht auf Transportmängel untersucht werden. Der Grund, daß auch bei den Glutamat-Test keine Mutanten eindeutig identifiziert wurden, kann z. B. damit zusammenhängen, das es in Gram-negativen Bakterien mehr als ein Transportsystem für die Aminosäuren Asp, Asn, Gln und Glu gibt. So sind in *E. coli* schon drei Transportsysteme für diese

Aminosäuren bekannt. Aber auch in verschiedenen *Rhodobacter*-Spezies wurden mehr als ein Transporter entdeckt [Jacobs *et al.*, 1995; Zheng & Haselkorn, 1996]. Bei Untersuchungen an *Rhodobacter sphaeroides* wurde festgestellt, daß nach Inaktivierung eines Transporters ein weiterer Transporter noch aktiv ist. Dieser hatte allerdings eine wesentlich geringere Aktivität [Zheng & Haselkorn, 1996].

Mit der letzten Selektion (Abb. 4.13 (3)) sollten Mutanten mit Defekten in der Glutaminverwertung gesucht werden. Diese Selektion beruhte auf dem Einsatz des toxischen Glutaminanalogen  $\gamma$ -Glutamylhydrazid. Wenn dieses Substrat abgebaut wird, werden toxische Hydraziniumionen freigesetzt, die zum Tod der Zellen führen. Dabei war es möglich, sowohl Mutanten mit einem Glutamat-Abbau-Defekt, als auch Transport-Mutanten zu identifizieren. Aufgrund der Tatsache, daß außer der Pf-GA nichts über Glutamin-verwertende Enzyme bekannt war, hatte auch diese Selektion Mängel. In Abbildung 5.7 sind die verschiedenen Möglichkeiten schematisch dargestellt, die bei dieser Selektion berücksichtigt werden müssen.

Da nicht genau bekannt ist, ob Hydraziniumionen über einen Transporter oder über Diffusion in die Zelle gelangen, kann es sich bei Zellen, die überleben (Abb. 5.7 (1)), um Transport-Mutanten (defekter Transporter für Hydraziniumionen) handeln.

Bei der Möglichkeit Abb. 5.7 (2) können nur Mutanten identifiziert werden, wenn die beim Abbau entstandenen Hydraziniumionen in die Zelle gelangen. Ob Defekte in der Pf-GA vorliegen, wurde mit einem AHA-Test untersucht. Bei der Möglichkeit in Abb. 5.1 (3)) wird vorausgesetzt, daß keine Defekte in der Pf-GA vorliegen und die Hydraziniumionen nicht in die Zelle gelangen. In diesem Fall würden die Bakterien nur überleben, wenn die Zellen Defekte in einem Glutamin-Transportsystem besitzen. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich. Ob ein solcher Defekt vorliegt, kann unter der Voraussetzung, das Glutamin und Glutamat von demselben Transportprotein in die Zelle transportiert werden, mit dem Glutamat-Test untersucht werden. Die meisten Aminosäure-Transporter sind Bindeprotein-abhängige Transportsysteme, bei denen der Transport mit der Hydrolyse von ATP gekoppelt ist [Zheng & Haselkorn, 1996; Jacobs *et al.*, 1995, Krämer, 1999]. Außerdem gibt es durch die protonmotorische Kraft angetriebene Transportproteine. Die Bindeprotein-abhängigen Systeme transportieren



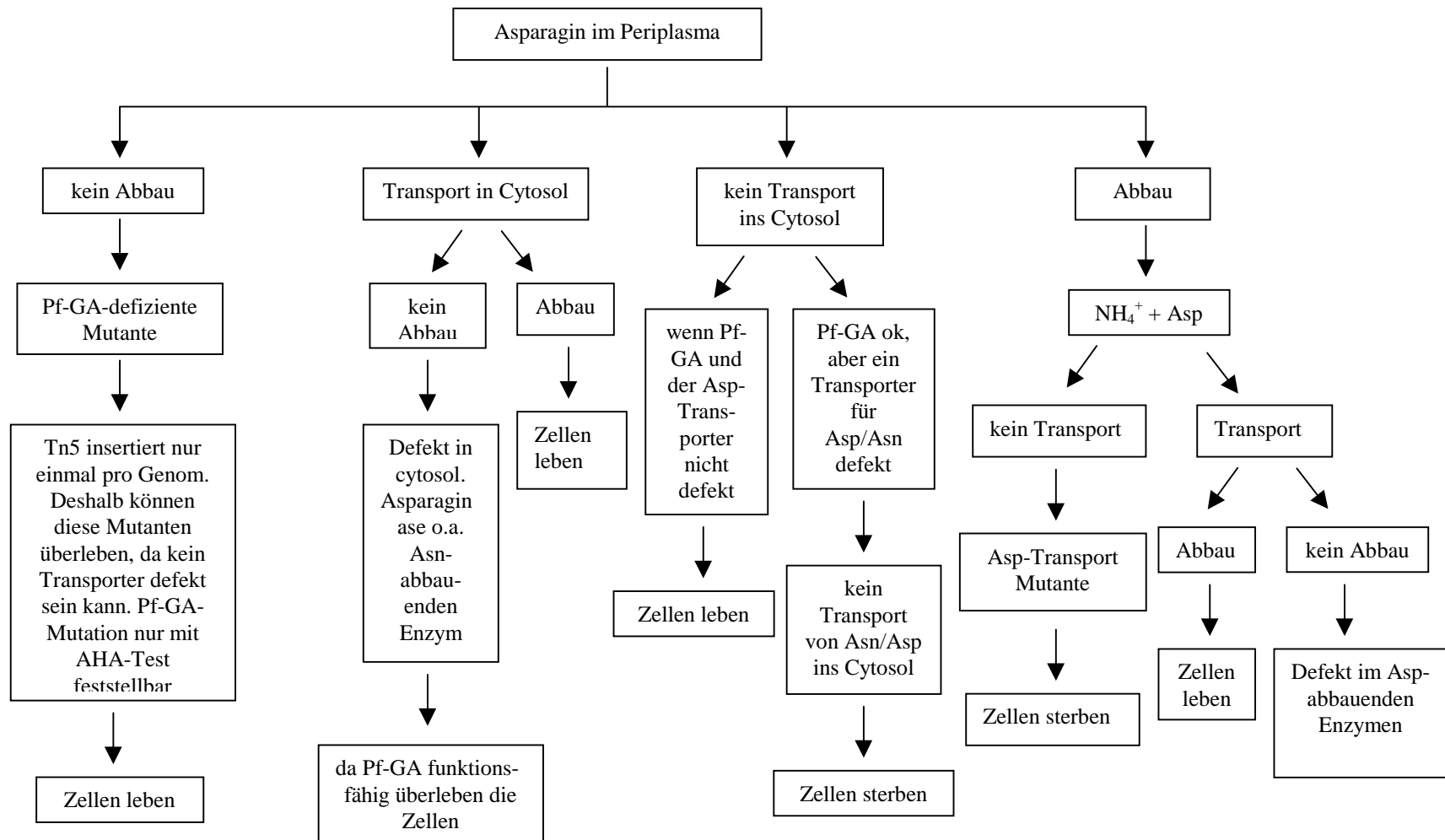


Abb. 5.6: Selektionsstrategie für die Suche nach Mutanten mit Defekten in der Asparaginverwertung

meistens mehr als eine Aminosäure. Bekannt sind Transporter, die entweder Glutamin/Glutamat, Asparagin/Aspartat, Asparagin/Glutamin oder Aspartat/Glutamat transportieren. Das ist möglich, da diese Transportsysteme für die einzelnen Aminosäuren jeweils ein Bindeprotein besitzen. Die integralen Membranproteine, die den eigentlichen Transport bewirken, sind für die beiden Bindeproteine identisch.

Wie diese Ausführungen zeigen, war mit dieser Selektion auch keine eindeutige Identifizierung von Mutanten möglich. Der Glutamat-Test sollte nur dann Mutanten identifizieren, wenn ein Transporter für Glutamat und Glutamin vorliegt, bei dem die integrale Membrandomäne defekt ist. Ein weiteres Problem war die Instabilität des  $\gamma$ -Glutamylhydrazids. Im Falle des spontanen Zerfalls (vgl. Abb. 5.7 (4)), würden die Zellen nur überleben, wenn die freigesetzten Hydraziniumionen nicht in die Zelle gelangen. Bei der Selektion in Abb. 4.13 (2) wurden einige Mutanten gefunden, die nicht mehr auf Asparagin wuchsen, obwohl sie eine spezifische *ansB*-Bande und AHA-Aktivität zeigten. Diese Zellen müssen näher charakterisiert werden, um zu klären, ob sie Transportdefekte besitzen.

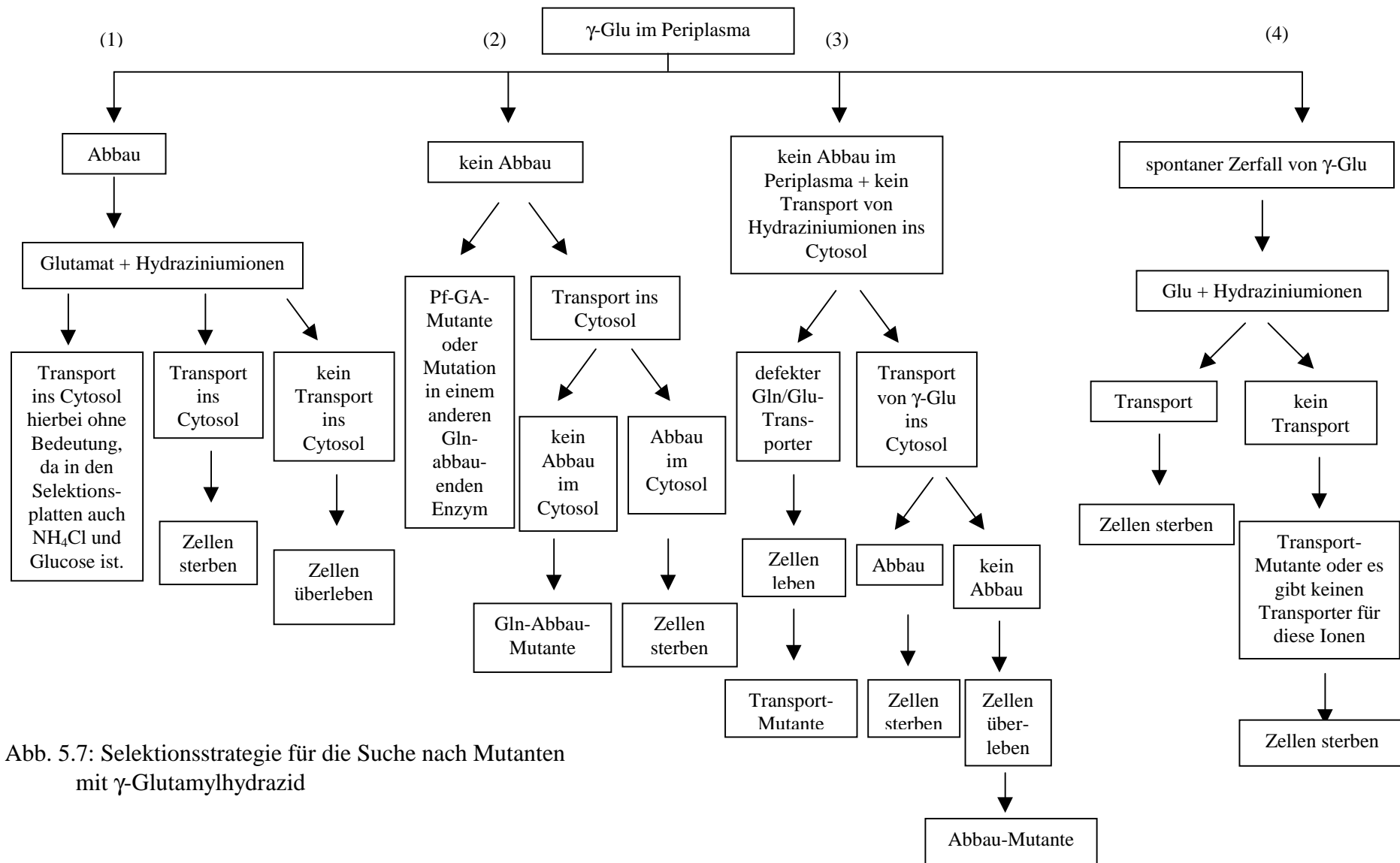


Abb. 5.7: Selektionsstrategie für die Suche nach Mutanten mit  $\gamma$ -Glutamylhydrazid

## 5.5 Identifizierung eines extrazellulären Endonukleasegens - *endX*

In dem Genbankklon, der das unvollständige *ansB*-Gen aus *P. fluorescens* enthielt, lag stromabwärts ein weiterer offener Leserahmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses ORF ergab eine gute Übereinstimmung zu extrazellulären Nukleasen, DNasen und Endonukleasen (vgl. Alignment in Abb. A2). Aminosäurereste, die in diesen Enzymen hochkonserviert sind, sind auch im *P. fluorescens*-Protein konserviert. Deswegen wurde das gefundene Gen mit *endX* (eine Endonuklease mit nicht genau bekannter Funktion) bezeichnet. Das vorhandene Signalpeptid deutet auf eine Sekretion des Enzyms ins Periplasma oder den Extrazellulärraum hin.

Endonukleasen, Nukleasen und DNasen sind Enzyme, die meistens unspezifisch doppelsträngige und einzelsträngige, sowie zirkuläre DNA in Oligonukleotide spalten. In einigen prokaryotischen Spezies wurden bereits extrazelluläre bzw. periplasmatische DNasen identifiziert. Zu ihnen gehören die extrazelluläre Nuclease (NucM) aus dem phytopathogenen Enterobakterium *E. chrysanthemi* [Moulard *et al.*, 1993], die extrazelluläre DNase aus *Aeromonas hydrophila* [Ming Chung Chang *et al.*, 1992], sowie die extrazelluläre DNase I aus *Vibrio cholerae* [Focareta *et al.*, 1991]. Auch bei weiteren Vertretern der Vibrionaceae, wie z. B. *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus* und *V. costicolus* wurden solche Enzyme gefunden [Focareta *et al.*, 1991]. Außerdem wurde die periplasmatische Endonuklease von *E. coli* (EndoI) untersucht [Jekel *et al.*, 1995]. Obwohl die Gene für diese Enzyme kloniert und charakterisiert wurden, ist noch nichts über ihre genaue biologische Funktion bekannt. Viele Gram-negative Bakterien besitzen die Fähigkeit, bestimmte Proteine, unter anderem Proteasen und Cellulasen, in den Extrazellulärraum zu sezernieren. Ein Grund für die Abgabe dieser Enzyme könnte die Bereitstellung weiterer Nahrungsquellen sein. Die extrazellulären DNasen verhindern auf jeden Fall die Aufnahme von Fremd-DNA. Das wurde durch die Bestimmung der Transformationsraten von Nuclease-negativen *V. cholerae*-Mutanten bewiesen [Focareta *et al.*, 1991]. Bei *E. chrysanthemi* wird vermutet, daß eine höhere Transformations- und Elektroporationsrate mit der Inaktivierung der DNasen zusammenhängt. Welche Vorteile die Bakterien erhalten, wenn sie keine Fremd-DNA aufnehmen, ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, daß sich die Bakterien durch Verhinderung der Aufnahme von Fremd-DNA vor zu häufigen Veränderungen ihres Genoms schützen. Obwohl die natürliche Transformation für die Anpassung der Bakterien an sich ändernde Umweltbedingungen notwendig ist, würden zu häufig

auftretende Transformationen bzw. Rekombinationen eher schaden als nützlich sein. Durch ein Vorkommen der Endonukleasen im Periplasma könnten sich die Bakterien außerdem vor dem Eindringen von Bakteriophagen-DNA schützen.

Untersuchungen an *V. cholerae* weisen auf eine weitere mögliche Funktion der extrazellulären DNasen hin. Für die Pathogenese von *V. cholerae* ist es notwendig, daß die Bakterien die Dünndarmschleimhaut effizient besiedeln. Einen möglichen Besiedelungsvorteil könnten die Cholerabakterien durch extrazelluläre DNasen erhalten. Die Dünndarmschleimhaut enthält nämlich sehr viel DNA, die von abgestorbenen Dünndarmepithelzellen stammt und eine sehr gute Stickstoff- und Kohlenstoffquelle darstellt. Durch Sekretion der DNase in den Extrazellulärraum sind die Bakterien in der Lage, die DNA abzubauen und die Nukleotide als Nahrungsquelle zu nutzen [Focareta *et al.*, 1991].

Für Biokontroll-Bakterien ist eine effiziente Besiedelung der Rhizosphäre ebenfalls unerlässlich. Dazu müssen sie unter anderem um Nahrung mit anderen Mikroorganismen konkurrieren. In der Ectorhizosphäre befinden sich neben dem Wurzelschleim auch abgestorbene Wurzelkappenzellen. Wenn die Pseudomonaden durch Sekretion von EndX die DNA der abgestorbenen Zellen als Nahrung nutzen könnten, besäßen sie einen Besiedelungsvorteil. Ob EndX ein bedeutender Faktor für die Biokontrolle ist kann allerdings nicht gesagt werden. Dazu müßte die Aktivität und Regulation dieses Proteins genauer untersucht werden.

## 5.6 Ausblick

Bei den bisher durchgeführten Selektionen wurden noch keine eindeutigen Mutanten festgestellt. Die Vermutung, daß es sich bei den durch die Selektion auf M9<sup>-</sup>-Glutamatplatten (vgl. Abb. 4.13 (2)) identifizierten Mutanten, um Transport-Mutanten handelt, muß erst noch bestätigt werden. Dazu ist es zunächst notwendig ein Verfahren zur einfachen Bestimmung der Aufnahme der einzelnen Aminosäuren zu entwickeln. Da, wie bereits erwähnt, viele Aminosäure-Transporter mehr als eine Aminosäure transportieren, kommt daher der Einsatz weiterer toxischer Substratanaloga von Asparagin, Aspartat und Glutamat, in Frage. Toxische Substrate könnten auch helfen, weitere Enzyme, die auch an der Verwertung der genannten Aminosäuren beteiligt sind, zu erkennen. Am sinnvollsten wäre es aber, zunächst eine „knock-out“-Mutante des

*P. fluorescens ansB*-Gens herzustellen. Die Untersuchung solch einer Mutante könnte zeigen, ob es im Periplasma weitere Enzyme für den Abbau von Glutamin und Asparagin gibt. Dies würde auch eine etwas sicherere (differenziertere) Selektion nach weiteren Mutanten ermöglichen. Außerdem würde die Konstruktion einer Pf-GA „knock-out“-Mutante die Voraussetzung für Besiedelungsstudien schaffen. Durch einen Vergleich der Besiedlungsfähigkeit des *P. fluorescens* WT und der Pf-GA-Mutante kann dann auch geklärt werden, ob die Pf-GA für die Besiedelung und damit für die Biokontrolle von Bedeutung ist. Da die Biokontrollfunktion von *P. fluorescens* Pf-5 bereits bewiesen wurde, wäre es auch sinnvoll, die genannten Untersuchungen vor allem mit diesem Stamm fortzuführen. Weiterhin wäre es sinnvoll die Promotorstruktur des *ansB*-Gens durch Deletionsmutagenese zu untersuchen. Dadurch könnten auch Hinweise auf die genaue Regulation dieses Gens erhalten werden.

## 6 Zusammenfassung

Die fluoreszierenden Pseudomonaden gehören zu Bodenbakterien, die als Biokontroll-Stämme eingesetzt werden. Ihr Habitat ist die Rhizosphäre vieler Getreide- und Gemüsearten. Die Wurzelexsudate dieser Pflanzen sind reich an Aminosäuren, dabei machen die Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat bis zu 50 % aus. In dem Wildtyp-Stamm *P. fluorescens* sollten Enzyme, die an der Verwertung der genannten Aminosäuren beteiligt sind, identifiziert, kloniert und charakterisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gen, das für eine Glutaminase-Asparaginase kodiert, aus dem *P. fluorescens* WT-Stamm kloniert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte signifikante Homologien zu bereits bekannten L-Asparaginase-Glutaminasen des Typs II. Dabei war die Übereinstimmung auf Proteinebene mit der PGA aus *Pseudomonas* sp. 7A mit 88 % am größten. Das Gen wurde in Anlehnung an andere Asparaginase des Typs II mit *ansB*, das davon abgeleitete Protein mit Pf-GA bezeichnet. Die Identifizierung eines Signalpeptids deutete auf eine periplasmatische Lokalisierung des Enzyms hin. Ein Aminosäuresequenzvergleich der ersten 10 Aminosäuren, mit einer aus dem Periplasma des gleichen Stammes nativ gereinigten Glutaminase-Asparaginase ergab eine 100 %ige Übereinstimmung. Das Gen konnte als His<sub>8</sub>-tag-Protein in *E. coli* überexprimiert und über Affinitätschromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden. Das gereinigte Enzym konnte L-Glutamin, L-Asparagin und D-Asparagin als Substrate nutzen. Diese Substratspezifität entsprach der Spezifität des nativ gereinigten Enzyms. Der Transkriptionsstartpunkt wurde 79 bp stromaufwärts vom ATG-Startcodon identifiziert. Der Bereich um -24 und -12 zeigte eine völlige Übereinstimmung mit Consensus-Sequenzen von  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren. Daß das *ansB*-Gen unter Kontrolle eines  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotors steht, wurde durch Aktivitätsvergleiche der Glutaminase-Asparaginase mit einer RpoN-defizienten Mutante von *P. putida* KT2440 bewiesen. Die Pf-GA wird durch Glutamat als einziger C- und N-Quelle im Medium induziert und durch NH<sub>4</sub>Cl und Glucose reprimiert. Während der WT *P. putida* KT2440 diese Regulation im Aktivitätstest zeigte, war diese Regulation bei der RpoN-Mutante vollständig ausgeschaltet. 447 bp stromabwärts vom *ansB*-Gen wurde ein weiterer offener Leserahmen von 687 bp gefunden. Dieser ORF zeigte Übereinstimmungen zu extrazellulären DNasen bzw. Endonukleasen verschiedener Bakterien. Die Proteinsequenz dieses Enzyms zeigte ebenfalls ein Signalpeptid. Durch Northernblot-Analyse konnte bewiesen werden, daß das *ansB*-Gen monocistronisch transkribiert wird. Die Regulation des *ansB*-Gens konnte durch Northernblot-Analyse bestätigt werden. Dabei ergab die RNA, die aus einer Kultur gewonnen wurde, die in Minimalmedium mit Glutamat als einziger C- und N-Quelle angezogen worden war, ein starkes Hybridisierungssignal mit einer spezifischen *ansB*-Sonde, während die RNA aus einer M9-Glucose-NH<sub>4</sub>Cl-Kultur nur ein sehr schwaches Signal zeigte. Weiterhin wurde eine Glutaminase - Asparaginase aus dem Biokontrollstamm *P. fluorescens* Pf-5 kloniert und sequenziert. Die DNA-Sequenz dieses Genes stimmte zu 82 %, die Proteinsequenz zu 92 % mit dem *ansB*-Gen aus dem *P. fluorescens* WT überein.

## 7 Anhang

		← PSGA 2	
1441	CGCTACACATTCCCCGCGCGACACCCGCTGTCTGAATGGACCGTCAAAACCAACTGGCTT		
1501	GATTTTAATAAGTTGCGAAATTCGTAACAGTTAAATACTGTATGCACGTACAGCACAGTA		
1561	AGGAATATTCCGTGGCAACGTCTTCTTCCGCAGCGCAAACCTCGCCTGACGCCTATACGC		
1621	GA CTGCGCGTTTCGTGTGCAAAAAATCATCAATTCGACCAACGCCAGAAAAGCCAAGGCCG		
1681	CCCTGATCTTCCGTTTGCCGGACGAGCCAGAGGAGGAATGGGGGCGCTTGCTGGAAGAAA		
1741	TAGCCGAGAACGACAACGTCACCCTCGCCTATCGGGATGATGGCGGCGTGCAGATATTCT		
	RBS		
1801	GGGTTGTGCCGAAGGAAGATTGATTCAATGAGTGCCCGTTTTATTGCTGTTTTTTGCTTG		
	G L C R R K I D S M S A R F I A V F C L		11
1861	TTTTTTACCGTTACCGCTCATGCTCAGGCGCCCCGAACCTTCAGTGAAAGCCAAGAAAAGTC		
	F F T V T A H A Q A P R T F S E A K K V		31
1921	GCCTGGAAGCTCTACGCACCACAGTCCACGGAGTTCTACTGCGGCTGCAAATACAATGGC		
	A W K L Y A P Q S T E F Y C G C K Y N G		51
1981	AACCGTGTGGATTTGAAAGCCTGCGGTTACGTCCCACGCAAAAATGCCAACCGCGCTGAC		
	N R V D L K A C G Y V P R K N A N R A D		71
2041	GCATCGAATGGGAACACATCGTCCCGGCTGGCAGATCGGGCATCAGCGCCAGTGCTGGC		
	A S N G N T S S R P G R S G I S A S A G		91
2101	AAGCCGGTGGGCGCAAAAATGTACGCGCTACGACGACGTGTTCAAGCGCGCCGAGGCGG		
	K P V G A K T V R A T T T C S S A P R R		111
2161	ACCTGCACAACCTGGTGCCGAGCATCGGTGAGGTCAATGGCGACCGTAACAACCTTCAGTT		
	T C T T W C R A S V R S M A T V T T S V		131
2221	TTGGATGGCTGCCGGTGCAACGTGGGCAAGTACGGGTGCTGCTGACCCAGGTGGACTTC		
	L D G C R C N V G K Y G S C L T Q V D F		151
2281	AAGCCAAGAAGGTCATGCCCCGCCCATCCATTGCGGGATGATCGCCCGGACCTATTTTC		
	K A K K V M P R P S I R G M I A R T Y F		171
2341	TATATGAGCAAACAATACGGCTTGCGCCTCTCCAAACAGGACCGCCAACCTGTATGAAGCC		
	Y M S K Q Y G L R L S K Q D R Q L Y E A		191
2401	TGGAACAAGACCTACCCCGTGCAACCTTGGGAGCGTCAGCGCAACCAGACCGTGGCGTGT		
	W N K T Y P V Q P W E R Q R N Q T V A C		211
2461	GTGATGGGCGCGGTAACGAGTTTGTGCGCCCGGTGAACCTGAAAGCCTGCGGCTGAAAA		
	V M G R G N E F V G P V N L K A C G *		229
2521	TGGGCGGGACTGCCGCCAACCTGCCGGTTACTGCGCAGTCTTGTGCTCGATAACCTGCG		
2581	ACTCGGTATCATTTTTCTTGCGCGTGCCAGTTTTTCGGTCAACAGGGCCTGCTTGCGCTT		
2641	CAGCTTCGGCCTTGCTCGCGAACGGGCCAGCAAAACCTCGTCCTTGCCGTCGGTCTTCA		
2701	CGATATAAAAATTGAAACCATGTTCCAGCAGCCAGGCGGTCAAGTCGGTGATCGCCTGCA		
2761	GTTTGTGGTCTGGCGGGCCACCCACACGTCCCCTGAGCGGCAATCACCCCGGTTT		
2821	GAGGCTGGTTCTCGGTACGGCAGGCTTGGCCT		

Abb. A1: DNA- und Proteinsequenz des Endonukleasegens (*endX*) aus *P. fluorescens* WT

Die DNA-Sequenz beginnt mit der Sequenzreihe, mit der der Primer PSGA2 hybridisiert (vgl. Abb. 4.1)



	1				50
EndX	...MSARFIA VFCLFFTUTA HAQAPRTFSE	AKKVAWKLYA	PQSTEFYCGC		
sDNase_Ah	..MFRPLLSL CLALLVSAPA HADNIQTFRA	AKQDLNKLQY	SHPVTFYCGC		
EndoI_Eco	MYRYSIAAV VLSAAFSGPA LAEGINSFSQ	AKAAAVKVHA	DAPGTFYCGC		
NuclM_Ech	MLRNLVIFAV LGAGLTTLAA AGQDINNFTQ	AKAAAAKIHQ	DAPGTFYCGC		
sDNase_Vc	...MMIFRFV TTLAASLPLL TFAAPISFSH	AKNEAVKIYR	DHPVSFYCGC		
		F AK a K	p FYCGC		
	51				100
EndX	KYN..GNR.. VDLKACGYVP RKNANRADAS	NGNTSSRPGR	SGISASAGKP		
sDNase_Ah	NIKFSGKKMA PDWESCGYLP GKQAERASRI	EWEHVVPawe	FGHQLQCWQD		
EndoI_Eco	KINWQGKKGV VDLQSCGYQV RKNENRASRV	EWEHVVPawQ	FGHQRCWQD		
NuclM_Ech	KINWQGKKGT PDLASCGYQV RKDANRASRI	EWEHVVPawQ	FGHQRCWQD		
sDNase_Vc	EIPWQGKKGI PDLESCGYQV RKNENRASRI	EWEHVVPawQ	FGHQLQCWQQ		
	i Gkk Dl sCGY rK nRAsr	ewehvvpaw	fGhq qcwq		
	101				150
EndX	VGAKTVRAT. .TTCSSAPRR TCTTWCRASV	R.SMATVTTS	VLDGCRCNVG		
sDNase_Ah	GGRKNCGKS. DEFNRMEGDM HNLFPaIGEV	NGDRANFRFS	DWNGKP...N		
EndoI_Eco	GGRKNCAKD. PVYRKMESDM HNLQPSVGEV	NGDRGNFMYs	QWNGGE...G		
NuclM_Ech	GGRKNCTKD. DVYRQIETDL HNLQPaIGEV	NGDRGNFMYs	QWNGGE...R		
sDNase_Vc	GGRKNCTRTS PEFNQMEADL HNLTPaIGEV	NGDRSNFSFS	QWNGVDG...V		
	gGrKnc e d hnl p geV ngdr nf S wnG				
	151				200
EndX	KYGSCLTQVD FKAKKVMpR. PSIRGMIART	YFYMSKQYGL	RLSKQDRQLY		
sDNase_Ah	QYGKCQMLVD FKERQVQPPK GPVRGQIARA	YLYMSQQYGL	RLAAQQRKLY		
EndoI_Eco	QYGQCAMKVD FKEKAAEPP. ARARGAIART	YFYMRDQYNL	TLSRQQTQLF		
NuclM_Ech	QYGQCEMKID FKSQLAEPP. ERARGAIART	YFYMRDRYNL	NLSRQQTQLF		
sDNase_Vc	TYGQCEMQVN FKERTAMAQ. SVQR.AIART	YLYMSEQYGL	RLSKAQTQLM		
	YG C m vd FK p Rg IARt Y YM qY L Ls Qq QL				
	201				250
EndX	EAWNKTYPVQ PWERQRNQTV ACVMGRGNEF	VGPVNLKACG	.....		
sDNase_Ah	EAWDRQYPAD RWECERNRRI GKLQGNTN..	..PFIEKQCQ	.....		
EndoI_Eco	NAWNKMYPVT DWECERDERI AKVQGNHN..	..PYVQRACQ	ARKS.....		
NuclM_Ech	DAWNKQYPAT TWECTREKRI AAVQGNHN..	..PYVQQACS	PDAAPYYNGL		
sDNase_Vc	QAWNQYPVS EWECVRDQRI EKVOGNSN..	..LLCACKCP	N.....		
	AWn YP WEc R ri qGn N p C				
	251				275
EndX	.....	.....	.....		
sDNase_Ah	.....	.....	.....		
EndoI_Eco	.....	.....	.....		
NuclM_Ech	SLIMIAAVAT VAARWLTPAG HLPsD				
sDNase_Vc	.....	.....	.....		

Abb. A2: Alignment der *P. fluorescens* Endonuklease (EndX) mit bekannten extrazellulären DNasen, Endonukleasen und Nukleasen

EndX = Endonuklease aus *P. fluorescens* WT; sDNase\_Ah = extrazelluläre DNase aus *A. hydrophila*; sDNase\_Vc = extrazelluläre DNase aus *V. cholerae*; EndoI\_Eco = Endonuklease I aus *E. coli*; NuclM\_Ech = Nuklease aus *E. chrysanthemi*

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHA	L-Asparaginsäure- $\beta$ -Hydroxamat
AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
Cb	Carbenicillin
CDP	4-Chloro-3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenyl phosphat
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Cm	Chloramphenicol
CSPD	3-(4-Methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenyl phosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddATP	Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethyl-pyroc carbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyroc carbonat (Dimethyldicarbonat)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig; Doppelstrang
DSM	Deutsche Stamm Sammlung
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GA	Glutaminase-Asparaginase
$\gamma$ -Glu	$\gamma$ -Glutamylhydrazid
GIDH	Glutamat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GS	Größenstandard
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IMAC	Immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie
INT	Iodnitrotriazoliumchlorid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin

kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
M	mol/l
mA	Milli Ampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	mmol/l
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
Ni	Nickel
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriacetat
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm
ORF	offener Leserahmen („Open Reading Frame“)
ori	Replikationsursprung
P	Pellet
p	Pico-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pfu	plaque forming units
PGA	Pseudomonas Glutaminase-Asparaginase
RACE	Rapid Amplification of cDNA ends
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen / Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang / einzelsträngig
T	Temperatur
t	Zeit
TB	Tris-Borat
TCA	Trichloressigsäure
TdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit unit / units
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp
xg	relative Zentrifugierkraft
X-Gal	5'-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galaktosid

## 9 Literaturverzeichnis

- Abril, M. A., Michan, C., Timmis, K. N., and Ramos, J. L.** 1989  
Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway.  
*J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790
- Acea, M. and M. Alexander** 1988  
Growth and survival of bacteria introduced into carbon amended soil  
*Soil Biol. Biochem.* **20**: 703-709
- Alting-Mees, M. A. and Short, J. M.** 1989  
pBluescript II: gene mapping vectors  
*Nucleic acids Res.* **22**: 9494
- Alting-Mees, M. A., Hoener, P., Ardourel, D. Sorge, J.A. and Short, J. M.** 1992  
 $\lambda$ ZAP Express from  $\lambda$  and pBK-CMV  
*Strategies* **5**: 58 - 61
- Alvarez-Morales, A. and Hennecke, H.** 1985  
Expression of *R. Japonicum nifH* and *nifDK* opoerons can be activated by the *K. pneumoniae nifA* protein but not by the product of *ntrC*  
*Mol. Gen. Genet.* **199**: 306-314
- Arshad, M. and W. T. Frankenberger**  
Microbial production of pülant growth regulators  
in: B. Metting (ed.); *Soil Microbial Technologies: Applications in Agriculture, Forestry and the environment*; Marcel Dekker, New York
- Atkinson, M. R. and S. H. Fisher** 1991  
Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *B. subtilis*  
*J. Bacteriol.* **173**: 23 - 27
- Ausubel, F. M.** 1984  
Regulation of nitrogen fixation genes  
*Cell* **37**: 5-6
- Bader, B., Knecht, W., Fries, M. and Löffler, M.** 1998  
Expression, purification, and characterization of histidine-tagged rat and human flavoenzyme dihydroorotate dehydrogenase  
*Protein. Expr. Purif.* **13** : 414-422
- Bagdasarian, M. and K. M. Timmis** 1982  
Host : vector plasmids for gene cloning in *Pseudomonas*  
*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **23**: 457 - 469
- Bakker, A. W., and B. Schippers** 1987  
Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth stimulation  
*Soil Biol. Biochem.* **19**: 451-457
- Barber, D. A. & Gunn, K. B.** 1974  
The effects of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions  
*New Phytol.* **73**: 39-45

**Barnes, E. M., and A. Jayakumar** 1993

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport systems in *E. coli*

in: Alkali cation transport systems in prokaryotes

CRC Press, Inc., Boca raton, Fla.; 397-409

**Bertoni G., Perez-Martin J. and de Lorenzo V.** 1997

Genetic evidence of separate repressor and activator activities of the XylR regulator of the

TOL plasmid, pWW0, of *Pseudomonas putida*

*Mol. Microbiol.* **23(1)**: 1221 - 1227

**Beutler H. O., Michal, G.** 1974

Glutamat - Bestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase, Diaphorase und

Tetrazoliums Salzen

aus *Methoden der enzymatischen Analyse von H. U. Bergmeyer*: 3. Auflage; Band II

Verlag Chemie; Weinheim

**Beynon, J., M. Cannon, V. Buchanan-Wollaston and F. Cannon** 1983

The *nif* Peromoters of *Klebsiella pneumoniae* Have a Characteristic Primary structure

*Cell* **34** 665-671

**Birnboim, H. C. and Doly, J.** 1979

a rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA

*Nucleic Acids Res.* **7**: 1513 - 1523

**Buck M., Cannon W.** 1992

Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promotor DNA

*Nature* **358**: 422 - 424

**Buck M., Miller S., Drummond M., Dixon R.** 1986

Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes

*Nature* **320**: 374 - 378

**Buck M., Miller S., Drummond M., Dixon R.** 1986

Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes

*Nature* **320**: 374 - 378

**Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J.M.** 1987

*Biotechniques* **5**: 376 - 379

**Burlage, R. S., Z. K. Yang; T. Mehlhorn** 1996

A transposon for green fluorescent protein transcriptional fusions: application for bacterial transport experiments

*Gene* **173**: 53-58

**Buyer, J. S. and J. Leong** 1986

Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains

*J. Biol. Chem.* **261**: 791-794

**Calos and Miller** 1980

Transposable Elements

*Cell* **20**: 579 - 595

**Campbell, R. and M. P. Greaves** 1990

Anatomy and community structure in the rhizosphere

*The Rhizosphere; J. M. Lynch (ed.)*; 11-34; Wiley & Sons, Chichester, England

- Casado, A., J.L. Caballero, A.R. Franco; J. C  denas, M.R. Grant, J. Munoz-Blanco** 1995  
Molecular cloning of the gene encoding the L-Asparaginase gene of *A. thaliana*  
*Plant physiol.* **108**: 1321-1322
- Cases I., de Lorenzo V. and Perez-Mart  n J.** 1996  
Involvement of  $\sigma^{54}$  in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid *Pu* promoter  
*Mol. Microbiol.* **19**(1): 7 -17
- Chesney, Robert H.** 1983  
*E. coli* L-asparaginase II production in the presence and absence of catabolite activating protein  
*FEMS Microbiol. Lett.* **17**: 161 - 162
- Collado-Vides, J., Magasanik, B. and Gralla, J.D.** 1991  
Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*  
*Microbiol. Rev.* **55**: 371 - 394
- Corbell, N. and J. E. Loper** 1995  
A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5  
*J. Bacteriol.* **177**: 6230-6236
- De Lorenzo, V. , M. Herrero, U. Jakuzik and K. N. Timmis** 1990  
Mini-Tn5 Transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative Eubacteria  
*J. Bacteriol.* **172**: 6568 - 6572
- de Weger L. A., A. J. van der Bij, L. C. Dekkers, M. Simons, C. A. Wijffelman, B.J.J. Lugtenberg** 1995  
Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial *pseudomonads*  
*FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 221 - 228
- Derst, C., Wehner, A., Specht, V. and R  hm, K. H.** 1994  
States and functions of tyrosine residues in *E. coli* asparaginase II  
*Eur. J. Biochem.* **224**: 533 - 540
- Dickson, J.M.J.J., E. Vincze, R. M. Grant, L. A. Smith, K. A. Rodber, K.J.F. Farnden and P.H.S. Reynolds** 1992  
Molecular cloning of the gene encoding developing seed L-asparaginase from *Lupinus angustifolius*  
*Plant Mol. Biol.* **20**: 333 - 336
- DSM** 1993  
Catalogue of strains  
DSM; Braunschweig
- Fedi, S., D. Brazil, D. N. Dowling, F. O  Gara** 1996  
Construction of a modified mini-Tn5 lacZY non-Antibiotic marker cassette: ecological evaluation of a lacZY marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere  
*FEMS Microbiol. Lett.* **135**:251-257
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** 1983  
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity  
*Anal. Biochem.* **132**: 6 - 13
- Fischer** 1994  
Genetic Control Of Rhizobial Nitrogen Fixation  
*Microbiol. Rev.* **58**: 364-366

**Focareta, T. and Manning, P. A.** 1991

Distinguishing between the extracellular DNases of *V. cholerae* and development of a transformation system

*Mol. Microbiol.* **5**: 2547 - 2555

**Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G.R.** 1988

*Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**:8998

**Fuchs, G.** 1999

How nitrogen, phosphorous, sulfur, one carbon units, and molecular oxygen are incorporated into cell compounds

in: *Biology of the Prokaryotes*; J. W. Lengeler, G. Drews, H. G. Schlegel (ed.); 851-871

Thieme Verlag Stuttgart, New York

**Gallagher, M. P., Marshall, R. D., and R. Wilston** 1989

Asparaginases as a drug for treatment of acute lymphoplastic leukaemia

*Essays Biochem.* **24**:1-40

**Gallegos M. T., Marques S. and Ramos J. L.** 1996

Expression of the TOL Plasmid *xylS* gene in *Pseudomonas putida* Occurs from a  $\sigma^{70}$ -Dependent promoter or from  $\sigma^{70}$ - and  $\sigma^{54}$ -Dependent Tandem Promoter According to the Compound Used for Growth

*J. Bacteriol.* **178**: 2356 - 2361

**Garcia, E., S. Bancroft, S. G. Rhee and S. Kustu** 1977

The product of a newly identified gene *glnF*, is required for synthesis of glutamine synthetase in *Salmonella*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1662 - 1666

**Guo Y. and Gralla J.D.** 1997

DNA-Binding Determinants of Sigma 54 as deduced from Libraries of Mutations

*J. Bacteriol.* **179**: 1239 - 1245

**Gussin, G. N., C. W. Ronsson and Ausubel F.M.** 1986

Regulation of nitrogen fixation genes

*Annu. Rev. Genet.* **20**: 567-591

**Harms, E., Wehner, A., Jennings, M. P., Beacham, I. R. and Röhm, K. H.** 1991

Construction of expressions systems for *E. coli* asparaginase II and two-step purification systems of the recombinant enzyme from periplasmic extracts

*Protein Expr. Purif.* **2**: 144 - 150

**Helmann & Chamberlin** 1988

Structure and function of bacterial sigma-factors

*Biochemistry oder Annu. Rev. Biochem* **57**: 839-872

**Howell, C. R., and R. D. Stipanovic** 1980

Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *P. fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin

*Phytopathology* **77**: 712-715

**Hüser, A., Klöppner, U., Röhm, K.H.** 1999

Cloning, sequence analysis, and expression of *ansB* from *Pseudomonas fluorescens*, encoding periplasmatic glutaminase/asparaginase

*FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 327-335

**Imada A., S. Igarasi, K. Nakahama and M. Isono** 1973

Asparaginase and Glutaminase activities of micro-organisms

*J. Gen. Microbiol.* **76**: 85 - 99

- Inouye, S., Y. Ebina, A. Nakazawa and T. Nakazawa** 1984  
Nucleotide sequence surrounding transcription initiation site of xylABC operon on TOL plasmid of *P. putida*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1688-1691
- Jacobs, M. H. J., A. J. M. Driessen and W. N. Konings** 1995  
Characterization of a binding Protein-dependent glutamate transport system of *Rhodobacter sphaeroides*  
*J. Bacteriol.* **177**: 1812 - 1816
- Jacobs, M. H. J., Driessen, A. J. M., Konings, W. N.** 1995  
Characterization of a protein-dependent glutamate transport system of *Rhodobacter sphaeroides*  
*J. Bacteriol.* **177** (7):1812-1816
- Jakob, C. G., K. Lewinski, M. W. LaCount, J. Roberts and L. Lebioda** 1997  
Ion binding induces closed conformation in Pseudomonas 7A Glutaminase-Asparaginase (PGA): Crystal Structure of the  $\text{PGA-SO}_4^{2-} - \text{NH}_4^+$  Complex at 1.7 Å resolution  
*Biochemistry* **36**: 923 - 931
- Jekel, M. and Wackernagel, W.** 1995  
Location of the endA gene coding for endonuklease I on the physical map of the *E. coli* K-12 chromosome  
*J. Bacteriol.* **176**: 1550 - 1551
- Jennings M. P. and I. R. Beacham** 1990  
Analysis of the *E. coli* gene encoding L-asparaginase II, *ansB*, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR protein  
*J. Bacteriol.* **172**: 1491 - 1498
- Jennings M. P., J. K. Anderson and I. R. Beacham** 1995  
Cloning and molecular analysis of the *Salmonella enterica ansP* gene, encoding an L-asparagine permease  
*Microbiol.* **141**: 141 - 146
- Jennings M. P., Shaun P. Scott and I. R. Beacham** 1993  
Regulation of the *ansB* gene of *Salmonella enterica*  
*Mol. Microbiol.* **9**(1) : 165 - 172
- Jennings P. and I. R. Beacham** 1993  
Co-dependent positive regulation of the *ansB* promoter of *E. coli* by CRP and the FNR protein: amolecular analysis  
*Mol. Microbiol.* **9**(1): 155 - 164
- Jerlström, P. G., J. Liu and I. R. Beacham** 1987  
Regulation of *E. coli* L-asparaginase II and L-aspartase by the *fnr* gene-produkt  
*FEMS Microbiol. Lett.* **41**: 127 - 130
- Keane, P. J., Kerr, A. and New, P. B.** 1970  
Crown gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium isolates*  
*Aust. J. Biol. Sci.* **23**: 674 - 676
- Kim Y. , Watrud L. S., Matin A.** 1995  
A Carbon Starvation Survival Gene of *Pseudomonas putida* Is Regulated by  $\sigma^{54}$   
*J. Bacteriol.* **177**: 1850 - 1859



**Klöppner 1999**

Dissertation Dez. 1999: Assimilation der Aminosäuren Asp und Glu und ihrer Säureamide Asn und Gln durch Pseudomonaden  
Uni. Marburg; FB Chemie

**Kluepfel D.A. 1993**

The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere  
*Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 441 - 472

**Köhler, T., S. Harayama, J. L. Ramos and K. N. Timmis 1989**

Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN  $\sigma$  Factor in Regulation of Various Metabolic Functions  
*J. Bacteriol.* **171**: 4326-4333

**Krämer, R. 1999**

Regulation and Diversity of transportsystems  
in: *Biology of the Prokaryotes*; J. W. Lengeler, G. Drews, H. G. Schlegel (ed.); 851-871  
Thieme Verlag Stuttgart, New York

**Kustu 1989**

Expression of  $\sigma^{54}$  (ntrA) - dependent genes is probably united by a common mechanism  
*Microbiol. Rev.* **53**: 367 - 376

**Lewington J., S. D. Greenaway and B. J. Spillane 1987**

Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis  
*Lett. Appl. Microbiol.* **5**: 51 - 53

**Lifshitz, R., J. W. Kloepper, M. Kozlowski, C. Simonson, J. Carlson, E. M. Tipping and I. Zaleska 1987**

Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions  
*Can. J. Microbiol.* **33**: 390-395

**Loper, J. E. and J. S. Buyer 1991**

Siderophores in microbial interactions on plant surfaces  
*Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 5-13

**Lubkowski J., A. Wlodawer, H. L. Ammon, T. D. Copeland and A. L. Swain 1994**

Structural characterization of *Pseudomonas* 7A Glutaminase-Asparaginase  
*Biochemistry* **33**: 10257 - 10265

**Lubkowski, J., G. J. Palm, G. L. Gilliland, C. Derst, K. H. Röhm and A. Wlodawer 1996**

Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-Asparaginase  
*Eur. J. Biochem.* **241**: 201-207

**Lugtenberg, B. J. J. and L. A. de Weger 1992**

Plant Root Colonization by *Pseudomonas* spp.  
in: *Pseudomonas - Molecular Biology and Biotechnology*: 13-19; Galli, Silver, Withold;  
Am. Soc. Microbiol.; Washington DC

**Lynch, J. M. 1990**

Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil  
*The Rhizosphere*, J. M. Lynch (ed.): 1-10; Wiley & Sons, Chichester, England

**Manna S., A. Sinha, R. Sadhukhan, S. L. Chakrabarty 1995**

Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405  
*Curr. Microbiol.* **30**: 291 - 298

**Merrick M. J. and R. A. Edwards** 1995

Nitrogen control in bacteria

*Microbiol. Rev.* **59**: 604 - 622

**Merriman T. R. and I. L. Lamont** 1993

Construction and use of a self-cloning promotor probe for gram-negative bacteria

*Gene* **126**: 17 - 23

**Ming Chung Chang, Shwu Yuh Chang, Shing Li Chen and Show Mei Chuang** 1992

Cloning and expression in *E. coli* of the gene encoding an extracellular

deoxyribonuklease (DNase) from *A. hydrophila*

*Gene* **122**: 175-180

**Minton N. P., T. Atkinson and R. F. Sherwood** 1983

Molecular cloning of the *Pseudomonas* Carboxypeptidase G<sub>2</sub> Gene and ist expression in

*E. coli* and *Pseudomonas putida*

*J. Bacteriol.* **156**: 1222 - 1227

**Minton, N. P. and L. E. Clarke** 1985

Identification of the promotor of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G2

*Mol. Appl. Genet.* **3**: 26-35

**Moulard, M., Condemine, G. and Robert-Baudouy, J.** 1993

Characterization of the nucM gene coding for a nuclease of the phytopathogenic bacteria

*E. chrysanthemi*

*Mol. Microbiol.* **8**: 685 - 695

**Mullis, K. B. and F. A. Faloona** 1987

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction

*Methods Enzymol.* **155**: 335

**O'Gara, F., U. B. Priefer, D. N. Dowling, M. P. Nuti** 1999

Prokaryotes in Agriculture

in: *Biology of the Prokaryotes*; J. W. Lengeler, G. Drews, H. G. Schlegel (ed.); 851-871

Thieme Verlag Stuttgart, New York

**O'Sullivan, D. J. and F. O'Gara** 1992

Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root

Pathogens

*Microbiol. Rev.* **56**: 662-676

**Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, and M. Doudoroff** 1973

Nucleic-acid homologies in genus *Pseudomonas*

*Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 333-339

**Pérez-Martin J., de Lorenzo V.** 1995

The  $\sigma^{54}$ -Dependent Promotor *Ps* of the TOL Plasmid of *Pseudomonas putida* Requires

HU for Transcriptional Activation In Vivo by XylR

*J. Bacteriol* **177**: 3758 - 3763

**Pérez-Martin J., Rojo F., de Lorenzo V.** 1994

Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene

expression

*Microbiol. Rev.* **58**: 268 - 290

**Philippot L., A. Clays-Josserand and R. Lensi** 1995

Use of Tn5 mutants to assess the role of the dissimilatory nitrite reductase in the

competitive abilities of two *Pseudomonas* strains in soil

*Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1426 - 1430

- Pitcher D. G., Saunders N. A., Owen R. J.** 1989  
Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate  
*Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 151 - 156
- Roberts J.** 1976  
Purification and properties of a highly potent antitumor glutaminase-asparaginase from *Pseudomonas* 7A  
*J. Biol. Chem.* **251**: 2119 - 2123
- Rombel I. T., Lamont I. L.** 1992  
DNA homology between siderophore genes from fluorescent *Pseudomonads*  
*J. Gen. Microbiol.* **138**: 181 - 187
- Ronson, C. W.** 1988  
Genetic regulation of C4-dicarboxylate transport in Rhizobia  
in: *Nitrogen Fixation: Hundred Years after*: 547-551;
- Saiki, R. K., Gelfant, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R. Horn, G. T. Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** 1988  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase  
*Science* **239**: 487 - 491
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989  
Molecular Cloning - A laboratory manual; 2<sup>nd</sup> edition  
Cold Spring Harbour, NY
- Sanger, F. S., Miklen, S. and A. R. Coulson** 1977  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 - 5467
- Schulz, M. and Werner, D.** 1998  
Enhancement of the antagonistic potential of *Pseudomonas fluorescens* towards *Phytophthora ultimum* on cucumber (*Cucumis sativus* L.) by flavonoids  
*J. Plant Disease and Protection* **105**: 157-167
- Shingler, V.** 1996  
Signal sensing by  $\sigma^{54}$ -dependent regulators: derepression as a control mechanism  
*Mol. Microbiol.* **19**: 409 - 416
- Shingler, V., and Moore, T.** 1994  
Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol catabolizing  
*Pseudomonas* sp. strain CF600.  
*J. Bacteriol.* **173**: 5928-5932
- Short J. M., M. Fernandez, J. A. Sorge and W. D. Huse** 1988  
 $\lambda$  ZAP: a bacteriophage  $\lambda$  expression vector with in vivo excision properties  
*Nucl. Acids. Res.* **15**: 7583 - 7600
- Short, J. M. and Sorge, J. A.** 1992  
In vivo excision properties of bacteriophage  $\lambda$  ZAP expression vectors  
*Methods Enzymol.* **216**: 495 - 508
- Siebert, P. D., Chenchik, A. Kellogg, D. E., Lukyanov, K.A. and Lukyanov, S. A.** 1995  
An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA  
*Nucleic Acids Res.* **23**: 1087 - 1088

**Simon R., Prierer U.; Pühler A.** 1983

A broad host range mobilization system for *in vivo* engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria

*Bio-Technology* **1**: 784 - 791

**Simon R., Quandt J. Klipp W.** 1989

New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria

*Gene* **80**: 161 - 169

**Smit E., van Elsas J. D., van Veen J. A., de Vos W. M.** 1991

Detection of plasmid transfer from *P. fluorescens* to indigenous bacteria in soil by using bacteriophage  $\phi$ R2f for donor counterselection

*Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3482 - 3488

**Stephens, P. M., M. O'Sullivan and F. O'Gara** 1987

Influence of bacteriophages on the colonization of strains of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of sugarbeet

*Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1164-1167

**Sun D. and P. Setlow** 1991

Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis ans* operon, which codes for L-asparaginase and L-aspartase

*J. Bacteriol.* **173**: 3831 - 3845

**Sun D. and P. Setlow** 1993

Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis ansR* gene, which encodes a repressor of the *ans* operon coding for L-asparaginase and L-aspartase

*J. Bacteriol.* **175**: 2501 - 2506

**Thöny, B. and H. Hennecke** 1989

The -24/-12 promotor comes of age

*FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 341-358

**Tolner, B., B. Poolman, B. Wallace and W. N. Konings** 1992

Revised nucleotide sequence of the *glpP* gene, which encodes the proton-glutamate-aspartate transport protein of *E. coli* K-12

*J. Bacteriol.* **174**: 2391 - 2393

**Ullrich, M. Penalzoza-Vazquez, A., Bailey, A. M. and Bender, C. L.** 1994

Cloning and expression of genes required for coronamic acid, an intermediate in the biosynthesis of the *P. syringae* phytotoxin coronatine

*J. Bacteriol.* **176**: 7574 - 7586

**van Elsas J. D., van Overbeek L. S., Feldmann A. M., Dulleman A. M., de Leeuw O.** 1991

Survival of genetically engineered *P. fluorescens* in soil in competition with the parent strain

*FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 53 - 64

**van Overbeek L. S., van Elsas J. D., van Veen J. A.** 1997

*P. fluorescens* Tn5-B20 mutant RA92 responds to carbon limitation in soil

*FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 57 - 71

**Vande Broek A. and J. Vanderleyden** 1995

The role of bacterial mobility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions

*MPMI* **8**: 800 - 810

**Vince E., Reeves J. M., Lamping E., Farnden K. J. F., Reynolds P. H. S.** 1994  
Repression of the L-asparaginase gene during nodule development in *L. angustifolius*  
*Plant mol. Biol.* **26**: 303 - 311

**Vogelstein, B. and Gillespie, D.** 1979  
Preparative and analytical purification of DNA from agarose  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615 - 619

**von Heijne, G.** 1986  
A new method for predicting signal sequence cleavage sites  
*Nucl. Acid Res.* **14**: 4683-4690

**Wehner, A., Derst, C., Specht, V. Aung, H.-P., and Röhm, K. H.** 1994  
The catalytic mechanism of *E. coli* asparaginase II  
*Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **375**: 108

**Wilson S. W. and R. E. Drew** 1995  
Transkriptional Analysis of the Amidase Operon from *Pseudomonas aeruginosa*  
*J. Bacteriol.* **177** : 3052 - 3057

**Zheng, S. and Haselkorn, R.** 1996  
A glutamate/glutamine/aspartate/asparagine transport operon in *R. capsulatus*  
*Mol. Microbiol.* **20**: 1001 - 1011